

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO

EN BIOCIENCIAS MOLECULARES

## **TESIS DOCTORAL**

# **EVALUACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN INMUNITARIA POSTRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE**

**M<sup>a</sup> del Pilar Sanz Martín**  
**Madrid, 2021**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

# **EVALUACIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN INMUNITARIA POSTRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE**

**M<sup>a</sup> del Pilar Sanz Martín**

Bióloga

Trabajo dirigido por:

**Cecilia Muñoz Calleja**

En el Hospital Universitario de la Princesa

Madrid, 2021

D<sup>a</sup> Cecilia Muñoz Calleja, Profesora Titular de Inmunología del Departamento de Medicina de la UAM y Facultativo de Inmunología del Hospital Universitario de La Princesa,

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Pilar Sanz Martín, titulado “Evaluación de la reconstitución inmunitaria postrasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos en pacientes con mieloma múltiple”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, firma la presente certificación a 11 de mayo de 2021

Fdo. Dra. Cecilia Muñoz Calleja

Directora de la Tesis Doctoral

*A mis padres*

*A mis abuelos*

***“Para saber a dónde vamos  
no hay que olvidar de dónde venimos”***

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Cecilia Muñoz Calleja por su dedicación, paciencia y entusiasmo. Por acogerme en su grupo y ayudarme a conseguir lo que tanto quería. Por aconsejarme en todos los ámbitos y poder contar siempre con ella. Por hacer de lo difícil algo sencillo. Gracias por el tiempo que te he robado y por darme tanto a cambio de tan poco. Es un placer trabajar a tu lado y aprender tanto de ti. Todo un ejemplo a seguir. **¡GRACIAS!**

Gracias a todo el Servicio de Inmunología en general y, en especial, al Dr. Sánchez Madrid por aceptarme en su servicio. A la Dra. Alfranca por ayudarme y aconsejarme. A la Dra. Calzada por sus sabios consejos y sus opiniones constructivas. A todos los residentes y exresidentes por las tardes compartidas en el citómetro. Muchas gracias a Víctor y Ana, por transmitirme sus saberes en citometría. Gracias también a Yaiza y Adri, por enseñarme el mundo de los cultivos celulares y por los buenos ratos pasados.

Y por supuesto no debe faltar una mención a Paula y Javi, por enseñarme que cuando las cosas están mal, hay que dar gracias, siempre pueden estar peor. Gracias por los momentos vividos, por los fines de semana trabajando en compañía y por ser como sois y colaborar en todo lo que podéis.

A Ana Arteché por “abrir la veda” del mieloma y dejarme en herencia esta tesis.

A los profesionales del Hospital de la Princesa que han colaborado activamente en las correcciones de esta tesis. A Gonzalo Benzo, por ayudarme en la parte más clínica y aconsejarme desde el punto de vista hematológico. A Eva Arranz por sus conocimientos en citogenética. A la unidad de apoyo metodológico, en especial a Ancor y por supuesto, a Lorena, por el apoyo en la estadística. A los informáticos, Sergio y Dani, por prestarme el programa que tanto me ha ayudado a graficar.

Gracias al Servicio de Análisis Clínicos, mi servicio. A mi jefa, la Dra. Sanz de Benito, por apostar una y mil veces por mí y darme la oportunidad de trabajar a su lado. Y como no... A mis dos mentoras, la Dra. Pascual y la Dra. Núñez de Arenas.

Gracias también al Dr. Calvo, Dr. San Román y la Dra. García, los que guiaron mis primeros pasos en el mundo de la investigación en Salamanca y me impulsaron a ser lo que soy. Aún me acuerdo de mis orígenes aislando conductos ductulares bajo la lupa.

A Pablito y su famoso ICP, en nada te veo a ti leyendo también. Por compartir batallas y cañas en las que duele la tripa de reír.

A Alberto, por sus vasos de leche *versus* mis cafés, por ese nivel *Advance* que ayuda en la escritura de *abstracts* y por esos postres llenos de Nutella que ayudan a coger fuerzas para superar la recta final.

A Marta y Sara, lo que unió Salamanca no lo separará la distancia.

Gracias a mis amigos, o, mejor dicho, a mis AMIGOS: Aurora, Elena, Julia, Adri, Nano, Risu y Bestia. Por estar ahí y apoyarme en mis proyectos. Y por esas casas rurales y esos viajes que te hacen volver a casa lleno de vida.

Gracias a mi familia, en especial a mi padre y a mi madre, por apoyarme en mis decisiones y ayudarme en todo lo que pueden y un poco más. A mi hermano, por contarme historietas del pueblo y saber poner vocecillas graciosas que te ríes aunque no quieras. Y a mi hermana, por ser mi confidente y una gran compañera de viaje, gracias por escucharme e intentar ayudarme siempre.

A mi abuela, con la que me hubiese gustado compartir esto, pero no pudo ser. Allá donde estés cuídame.

**RESUMEN/ABSTRACT**



El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más frecuente. Se caracteriza por la expansión clonal de células plasmáticas en médula ósea y la producción de inmunoglobulina monoclonal. El tratamiento de elección es la terapia combinada con quimioterapia a altas dosis, seguida de un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE). Sin embargo, muchos pacientes recaen y muy pocos logran el control a largo plazo de la enfermedad. Los mecanismos que subyacen a la progresión del MM, ya sea desde su lesión preneoplásica o en la recaída postTASPE, siguen sin estar bien caracterizados, aunque está aceptado que el sistema inmunitario juega un papel determinante.

Por ello, en este trabajo nos planteamos tres objetivos: 1) Cuantificar, mediante citometría de flujo, las distintas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica de los pacientes con diagnóstico reciente de MM para estudiar si presentan un perfil inmunitario característico y específico de la enfermedad; 2) Caracterizar la reconstitución inmunitaria postTASPE, tanto en pacientes que permanecen en remisión completa como en los que recaen; 3) Estudiar el papel de la reconstitución inmunitaria como factor protector de recaída.

Los pacientes con diagnóstico reciente de MM presentaron un perfil inmunitario consistente en: a) Un menor número de linfocitos totales y de linfocitos T (LT) CD4+, una disminución de LT *naïve* y un aumento de LT exhaustos, tanto T CD4+ como T CD8+, que es indicativo del desgaste del sistema inmunitario; b) Una disminución de los LB transicionales y *naïve* que refleja una inadecuada homeostasis humoral.

El proceso de reconstitución inmunitaria postTASPE de los pacientes con MM se caracterizó por: a) Un menor número de LT-CD4+ totales cuyas cifras no se recuperan hasta pasados 2 años; b) Una recuperación deficitaria de los LT *naïve*, que resalta la importancia de la timopoyesis en la reconstitución inmunitaria y el déficit de diversidad del repertorio antigénico resultante; c) Un aumento de los LB transicionales y de los plasmablastos, junto con una marcada disminución de los LB de memoria marginales y con cambio de clase, que evidencia el potencial para una adecuada recuperación de la homeostasis humoral; d) una recuperación deficitaria de IgM e IgA hasta pasados varios meses tras el trasplante, en probable relación con los hallazgos del punto anterior.

La reconstitución inmunitaria de los pacientes que recayeron tras el TASPE se caracterizó por: a) Un aumento de la proporción de los LT-CD4+ TEMRA junto con una disminución no significativa de la proporción de LT-CD4+ *naïve*; b) Un aumento no significativo de los LT-CD8+ exhaustos; c) Un aumento no significativo de LB de memoria con cambio de clase. Todo ello confirma la importancia de la vigilancia del sistema inmunitario en el mantenimiento de la remisión postTASPE.

Finalmente, identificamos la proporción de células NK NKG2D+ como un factor protector frente a la recaída, cuya validez será ratificada en estudios futuros de validación.

En conclusión, nuestro estudio aporta conocimiento sobre el estado de las subpoblaciones inmunitarias con capacidad antitumoral en los momentos del diagnóstico y recaída postTASPE en MM, que pueden refinar la elección de dianas en futuros tratamientos de inmunoterapia.

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematologic neoplasm. It is characterized by the clonal expansion of plasma cells in bone marrow and the production of monoclonal immunoglobulin. Standard treatment consists of high dose chemotherapy in combination with autologous stem cell transplantation (ASCT). However, many patients relapse and very few achieve long-term control of the disease. The mechanisms that underlie the progression of MM, either from its pre-neoplastic lesion or in post-ASCT relapse, are still not well characterized, although it is accepted that the immune system plays a determining role.

Therefore, in this thesis we had three objectives: 1) Use flow cytometry to quantify the different lymphocyte subpopulations of peripheral blood from patients with newly diagnosed MM to study whether they have a specific immune profile; 2) To characterize post-ASCT immune reconstitution, both in patients who remain in complete remission and in those who relapse; 3) To study the role of immune reconstitution as a protective factor for relapse.

Patients with a recent diagnosis of MM presented an immune profile consisting of: a) Fewer total lymphocytes and CD4+ T lymphocytes, a decrease in naïve T lymphocytes and an increase in exhausted T-cells, both CD4+ and CD8+, evidencing the exhaustion of the immune system; b) A decrease in both transitional and naïve B-cells, reflecting inadequate humoral homeostasis.

The post-ASCT immune reconstitution of MM patients was characterized by: a) A lower number of total CD4+ T-cells whose normal level is recovered after 2 years; b) A deficient recovery of naïve T-cells, which highlights the importance of thymopoiesis in the immune reconstitution and the diminished diversity of the resulting antigenic repertoire; c) An increase in transitional B-cells and plasmablasts, together with a marked decrease in memory B-cells, both marginal and class switched, which suggests the potential for an adequate recovery of humoral homeostasis; d) A deficient recovery of IgM and IgA until several months after transplantation, probably related to the findings in c).

Immune reconstitution in patients who relapsed after ASCT was characterized by: a) An increase in the proportion of LT-CD4+ TEMRA and a non-significant decrease of the proportion of naïve CD4+ T-cells; b) An insignificant increase in exhausted CD8+ T-cells and c) An insignificant increase of the class switched B-cells. These data suggest the importance of immunosurveillance in the maintenance of post-ASCT remission.

Finally, we identify the proportion of NKG2D+ NK cells as a protective factor against relapse, whose validity will be ratified in future validation studies.

In conclusion, our study provides knowledge about the status of the immune subsets with antitumor capacity at the time of diagnosis and post-ASCT relapse, which may refine the choice of targets in future immunotherapy treatments.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>1. Mieloma múltiple: definición.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Respuesta inmunitaria.....</b>	<b>37</b>
2.1 Inmunidad innata.....	38
2.1.1 Inmunidad innata celular.....	38
2.1.1.1 Células Natural Killer.....	38
2.2 Inmunidad adaptativa.....	39
2.2.1 Inmunidad adaptativa celular.....	39
2.2.1.1 Linfocitos T.....	39
2.2.1.2 Linfocitos B.....	42
2.2.2 Inmunidad adaptativa humoral.....	44
2.2.2.1 Estructura de una inmunoglobulina.....	44
<b>3 Patogenia del mieloma múltiple.....</b>	<b>44</b>
3.1 Célula plasmática.....	44
3.2 Eventos oncogénicos.....	45
3.3 Microambiente medular.....	46
3.4 Exosomas.....	47
3.5 Inmunidad antitumoral.....	47
<b>4 Clínica y diagnóstico del mieloma múltiple.....</b>	<b>49</b>
<b>5 Factores de pronóstico del mieloma múltiple.....</b>	<b>51</b>
5.1 Enfermedad mínima residual.....	51
<b>6 Sistema de estadiaje del mieloma múltiple.....</b>	<b>52</b>
<b>7 Tratamiento del mieloma múltiple.....</b>	<b>52</b>
7.1 Tratamiento de inducción en pacientes candidatos a trasplante autólogo.....	53
7.2 Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.....	53
7.3 Tratamiento de consolidación postrasplante autólogo.....	54
7.4 Tratamiento de mantenimiento postrasplante autólogo.....	54
7.5 Nuevas terapias: Inmunoterapia T-CAR.....	54
<b>8 Respuesta al tratamiento en mieloma múltiple.....</b>	<b>54</b>
<b>9 Reconstitución inmune postTASPE.....</b>	<b>55</b>
9.1 Reconstitución de células NK.....	55
9.2 Reconstitución de linfocitos B.....	56

9.3 Reconstitución de linfocitos T.....	56
<b>10 Nuevos biomarcadores en mieloma múltiple.....</b>	<b>58</b>
10.1 Biomarcadores del sistema inmunitario.....	58
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
1. Hipótesis de trabajo.....	63
2. Objetivos.....	63
<b>PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
1. Pacientes.....	67
1.1 Evaluación del perfil inmunitario en pacientes con mieloma múltiple de diagnóstico reciente, aféresis, MM postTASPE, MM-LTCR y recaídas.....	67
2. Muestras.....	67
3. Materiales.....	68
3.1 Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo.....	68
4. Métodos.....	69
4.1 Hemograma.....	69
4.2 Inmunofenotipo en sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica	69
4.2.1 Preparación de la muestra de sangre periférica.....	69
4.2.2 Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	70
4.3 Análisis de parámetros séricos.....	75
4.3.1 Parámetros bioquímicos.....	75
4.3.2 Inmunoglobulinas totales e isotipo de las inmunoglobulinas.....	75
4.3.3 Proteinograma y cuantificación del componente monoclonal.....	76
4.3.4 Cadenas ligeras libres.....	76
4.4 Estudios funcionales.....	76
4.4.1 Activación y proliferación.....	76
4.4.2 Análisis de la proliferación por citometría de flujo.....	76
<b>5 Análisis estadístico .....</b>	<b>78</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
1. Evaluación del inmunofenotipo de pacientes con mieloma múltiple al diagnóstico.....	83

1.1	Características de los pacientes.....	83
1.2	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de los pacientes con MM al diagnóstico.....	85
1.2.1	Caracterización de linfocitos T.....	85
1.2.2	Caracterización de linfocitos Treg.....	90
1.2.3	Caracterización de linfocitos T exhaustos.....	91
1.2.4	Caracterización de linfocitos B.....	93
1.2.5	Caracterización de células NK.....	95
<b>2</b>	<b>Evaluación de la reconstitución inmunitaria en pacientes con mieloma múltiple tras trasplante autólogo.....</b>	<b>97</b>
2.1	Características de los pacientes.....	97
2.1.1	Pacientes trasplantados.....	97
2.1.2	Pacientes MM-LTCR.....	99
2.2	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias tras trasplante autólogo en pacientes con MM.....	101
2.2.1	Caracterización de linfocitos T.....	101
2.2.2	Caracterización de linfocitos B.....	107
2.2.3	Caracterización de células NK.....	109
2.2.4	Reconstitución inmunidad humoral.....	111
2.2.4.1	Reconstitución IgG.....	111
2.2.4.2	Reconstitución IgA.....	112
2.2.4.3	Reconstitución IgM.....	112
2.2.5	Evaluación de la proliferación postASPE.....	113
<b>3</b>	<b>Evaluación del inmunofenotipo de las aféresis de pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple.....</b>	<b>114</b>
3.1	Características de los pacientes.....	114
3.1.1	Pacientes de las aféresis.....	114
3.2	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en las aféresis de los pacientes con MM.....	116
3.2.1	Caracterización de linfocitos T.....	116
3.2.2	Caracterización de linfocitos Treg.....	119
3.2.3	Caracterización de linfocitos B.....	120

3.2.4	Caracterización de células NK.....	121
<b>4</b>	<b>Caracterización de la reconstitución inmunitaria en las recaídas.....</b>	<b>122</b>
4.1	Caracterización de los pacientes.....	122
4.1.1	Pacientes que recaen.....	122
4.1.2	Pacientes en remisión.....	122
4.2	Estudio de Kaplan Meier del análisis de recaídas.....	123
4.3	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias y de las inmunoglobulinas en sangre periférica en las recaídas.....	124
4.3.1	Caracterización de linfocitos T y B.....	124
4.3.2	Caracterización de las inmunoglobulinas.....	126
4.4	Identificación de variables de la reconstitución inmunitaria predictoras de recaída.....	127
	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
1.	Respuesta del sistema inmunitario al mieloma múltiple.....	131
2.	Reconstitución inmunitaria.....	136
3.	Factores predictores.....	142
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>145</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>149</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



<u>Figura 1:</u> Patogénesis del MM .....	46
<u>Figura 2:</u> Inmunoedición en el microambiente de la MO del MM.....	48
<u>Tabla 1:</u> Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de sangre periférica.....	68
<u>Figura 3:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	72
<u>Figura 4:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	73
<u>Figura 5:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	74
<u>Figura 6:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	74
<u>Figura 7:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	75
<u>Tabla 2:</u> Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de proliferación.....	77
<u>Figura 8:</u> Estrategia de análisis para el estudio de proliferación.....	78
<u>Tabla 3:</u> Características de los pacientes de MM en el momento del diagnóstico.....	84
<u>Figura 9:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4+ y linfocitos T-CD8+ en sangre periférica de los pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	87
<u>Figura 10:</u> Distribución de células T CD4+ en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	88
<u>Figura 11:</u> Distribución de células T CD8+ en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	89
<u>Figura 12:</u> Distribución de células Treg en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	90
<u>Figura 13:</u> Distribución de células exhaustas en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	91
<u>Figura 14:</u> Distribución de células B en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	94
<u>Figura 15:</u> Distribución de células NK en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico y donantes sanos.....	96
<u>Tabla 4:</u> Características de los pacientes de MM que recibieron TASPE.....	98

<u>Tabla 5:</u> Características de los pacientes MM-LTCR.....	100
<u>Figura 16:</u> Distribución de células T CD4+ en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE, pacientes LTCR y donantes sanos.....	102
<u>Figura 17:</u> Distribución de células T CD8+ en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE, pacientes LTCR y donantes sanos.....	104
<u>Figura 18:</u> Distribución de células Treg en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE, pacientes LTCR y donantes sanos.....	106
<u>Figura 19:</u> Distribución de células B en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE, pacientes LTCR y donantes sanos.....	108
<u>Figura 20:</u> Distribución de células NK en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE, pacientes LTCR y donantes sanos.....	110
<u>Figura 21:</u> Evolución de los niveles de inmunoglobulina IgG postTASPE .....	111
<u>Figura 22:</u> Evolución de los niveles de inmunoglobulina IgA postTASPE .....	112
<u>Figura 23:</u> Evolución de los niveles de inmunoglobulina IgM postTASPE .....	113
<u>Figura 24:</u> Representación del porcentaje de proliferación postTASPE .....	114
<u>Tabla 6:</u> Características de los pacientes con MM que se realizó aféresis.....	115
<u>Figura 25:</u> Distribución de células T CD4+ en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM, aféresis y MM tras TASPE .....	117
<u>Figura 26:</u> Distribución de células T CD8+ en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM, aféresis y MM tras TASPE.....	118
<u>Figura 27:</u> Distribución de células Treg en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM, aféresis y MM tras TASPE .....	119
<u>Figura 28:</u> Distribución de células B en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM, aféresis y MM tras TASPE .....	120
<u>Figura 29:</u> Distribución de células NK en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM, aféresis y MM tras TASPE .....	121
<u>Figura 30:</u> Representación del estudio de Kaplan Meier .....	123
<u>Figura 31:</u> Evaluación de la distribución de células los LT y B en sangre periférica de pacientes con MM postTASPE que recaen y pacientes en remisión completa .....	125
<u>Figura 32:</u> Evaluación de la concentración de las cadenas ligeras en las recaídas en suero de pacientes con MM de tipo kappa.....	126
<u>Figura 33:</u> Evaluación de la concentración de las cadenas ligeras en las recaídas en suero de pacientes con MM de tipo lambda.....	126

<u>Tabla 7:</u> Resultados de la regresión de Cox.....	127
<u>Figura 35:</u> Esquema de los cambios en el sistema inmune desde el diagnóstico de mieloma múltiple hasta la recaída.....	135
<u>Figura 36:</u> Inmunoterapias para el mieloma múltiple.....	136
<u>Figura 37:</u> Inducción de un microambiente inmunológico favorable tras el TASPE.....	142

## **CLAVE DE ABREVIATURAS**

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>AcMo</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (del inglés “ <i>Antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity</i> ”)
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>BCR</b>	Receptor célula B (del inglés “ <i>B-cell-receptor</i> ”)
<b>cCLL</b>	Cociente cadenas ligeras libres (cadena libre $\kappa$ / cadena libre $\lambda$ )
<b>CL</b>	Cadena ligera
<b>CLL</b>	Cadenas ligeras libres
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>cfDNA</b>	ADN circulante libre (del inglés “ <i>circulating free DNA</i> ”)
<b>CG</b>	Centro germinal
<b>CM</b>	Componente monoclonal
<b>CMF</b>	Citometría de flujo
<b>CP</b>	Célula plasmática
<b>CPM</b>	Célula plasmática mielomatosa
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daño (del inglés “ <i>damage-associated molecular patterns</i> ”)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMR</b>	Enfermedad mínima residual
<b>FISH</b>	Hibridación in situ fluorescente
<b>FLC</b>	Cadena ligera libre (del inglés “ <i>free light chain</i> ”)
<b>Fc</b>	Fracción constante
<b>GL</b>	Ganglio linfático
<b>GMSI</b>	Gammapatía monoclonal de significado incierto
<b>GWAS</b>	Estudio de asociación del genoma completo (del inglés “ <i>genome-wide association study</i> ”)
<b>HEV</b>	Venas del endotelio alto (del inglés “ <i>high endothelial venules</i> ”)
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>IF</b>	Inmunofenotipo

<b>IFJ</b>	Inmunofijación
<b>IgH</b>	Cadena pesada de la inmunoglobulina
<b>Igs</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IMiDs</b>	Inmunomoduladores
<b>IMWG</b>	Grupo Internacional del mieloma (del inglés. <i>“International Myeloma Working Group”</i> )
<b>IP</b>	Inhibidor del proteasoma
<b>IR</b>	Insuficiencia renal
<b>iRC</b>	Remisión completa inmunofenotípica
<b>LCP</b>	Leucemia de células plasmáticas
<b>LB</b>	Linfocitos B
<b>LBreg</b>	Linfocitos B reguladores
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>LTCR</b>	Remisión completa de larga evolución (del inglés <i>“Long-term complete remission”</i> )
<b>MBRP</b>	Muy buen respuesta parcial
<b>MDSC</b>	Células supresoras mieloides (del inglés <i>“myeloid-derived suppressor cells”</i> )
<b>miR</b>	microRNA
<b>MM</b>	Mieloma múltiple
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>“major Histocompatibility Complex”</i> )
<b>MM-LTCR</b>	Pacientes con mieloma múltiple en remisión completa de larga duración (>6 años)
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>mRNA</b>	ARN mensajero
<b>NA</b>	No aplica
<b>ncRNA</b>	ARN no codificante
<b>ND</b>	No disponible
<b>NGS</b>	Secuenciación genómica de nueva generación o secuenciación masiva (del inglés, <i>“Next generation sequencing”</i> )
<b>NV</b>	No valorable

<b>OLS</b>	Órganos linfoides secundarios
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>RC</b>	Remisión completa
<b>RI</b>	Respuesta inmunitaria
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RP</b>	Respuesta parcial
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SI</b>	Sistema inmunitario
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>SMM</b>	Mieloma múltiple quiescente (del inglés, " <i>Smouldering multiple myeloma</i> ")
<b>SP</b>	Sangre periférica
<b>sRC</b>	Remisión completa estricta
<b>Tª</b>	Temperatura
<b>TAM</b>	Macrófagos asociados a tumor
<b>TASPE</b>	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
<b>TCR</b>	Receptor de célula T (del inglés " <i>T-cell-receptor</i> ")
<b>Texhausted</b>	Células o linfocitos T exhaustos
<b>Treg</b>	Células o linfocitos T reguladores
<b>β-2M</b>	β-2-microglobulina
<b>κ</b>	kappa
<b>λ</b>	lambda

## INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1. Mieloma múltiple: Definición.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas (CP) que se acumulan en médula ósea (MO) y destruyen el tejido óseo adyacente. Dichas CPs producen una inmunoglobulina monoclonal (también llamada componente monoclonal, paraproteína o proteína M), que en el 56% de los casos es de tipo IgG, seguido de IgA (27%), cadenas ligeras libres (13 %), IgD (<2 %), o puede incluso ser no secretor (2 %)(1),(2).

El MM supone el 1% de todos los cánceres y aproximadamente el 10% de todas las neoplasias hematológicas. Es la segunda neoplasia hematológica más común después del linfoma no Hodgkin y la media de edad de los pacientes al diagnóstico es de 70 años(3),(4).

El MM progresa desde un estado asintomático denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI, donde ya se observa una proliferación clonal de CPs. El MM se diferencia de la GMSI porque, en el primero, el porcentaje de infiltración tumoral en la MO es mayor del 10%)(5),(6).

La infiltración tumoral intramedular del MM se traduce en el daño orgánico asociado al MM o “CRAB” (del inglés, *calcium, renal failure, anemia and bone lesions*): hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas(1).

En los últimos años, la disponibilidad de fármacos inmunomoduladores (IMiDs, del inglés, *immunomodulatory imide drugs*) como la talidomida y la lenalidomida e inhibidores del proteasoma (IP) como bortezomib, en combinación o no con el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos con células de sangre periférica (TASPE), ha aumentado considerablemente la tasa de remisión completa (RC) así como la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG), situándose la mediana de supervivencia alrededor de los 6-7 años(7),(8).

### 2. Respuesta inmunitaria

El sistema inmunitario (SI) se ha clasificado tradicionalmente en SI innato y SI adaptativo(9), que trabajan conjuntamente para proteger al huésped frente a posibles patógenos y eliminar células tumorales y senescentes(10). Entre ambos sistemas median una respuesta inmunitaria (RI) tanto celular como humoral. Desde el punto de vista fenotípico, las distintas células que componen el SI se distinguen en base a la expresión de diferentes moléculas de superficie o intracelulares, denominados marcadores de diferenciación (CD: *clusters of differentiation*)(11).

## 2.1 Inmunidad innata

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa del huésped y proporciona una defensa inespecífica frente a agentes extraños(18). Se caracteriza por carecer de memoria inmunológica y por poseer mecanismos de reconocimiento de diversidad limitada codificados en la línea germinal.

La defensa por parte del SI innato se lleva a cabo mediante distintos mecanismos que incluyen barreras físicas, como la piel y mucosas, células como fagocitos y células asesinas naturales o NK (del inglés, *natural killer*) y factores solubles como el sistema del complemento, ciertas citocinas y los reactantes de fase aguda.

### 2.1.1 Inmunidad innata celular

Forman parte del SI innato las células hematopoyéticas derivadas del linaje mieloide que incluyen mastocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), neutrófilos, eosinófilos, así como del linaje linfóide como las células NK. Los mecanismos de defensa del SI innato están presentes antes de la exposición al microorganismo u otras moléculas extrañas y así el SI innato es capaz de reaccionar de manera inmediata y eficiente para servir de contención de los agentes patógenos(13). La RI innata no es completamente inespecífica ya que es capaz de reconocer determinadas moléculas asociadas a los patógenos, como ácidos nucleicos o componentes de las paredes bacterianas; a dichas moléculas las denominamos patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*). De forma similar, los patrones moleculares asociados a daño o DAMP (del inglés, *damage-associated molecular patterns*) son moléculas procedentes de daño celular y que también son reconocidas por las células del SI innato. El reconocimiento de los PAMP pone en marcha la fagocitosis y la respuesta inflamatoria cuya última finalidad es la de eliminar el patógeno o la célula dañada(13). La RI innata también participa en la puesta en marcha de la RI adquirida o específica(13).

#### 2.1.1.1. Células Natural Killer

Las células NK son linfocitos granulares pertenecientes al SI innato. Juegan un papel central en el control de las infecciones virales y enfermedades neoplásicas. Las células NKs se han definido como linfocitos CD3-CD56+ y pueden subdividirse en distintas subpoblaciones en función de la expresión de CD56 y CD16. Las células CD56+CD16- tienen un alto potencial de proliferación y la habilidad de secretar distintas citocinas, especialmente IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-12, mientras que las CD56+CD16+ tienen elevada capacidad citotóxica(14).

Las células NK pueden discriminar entre células infectadas con virus y células sanas sin necesidad de reconocimiento del antígeno (Ag), y tienen la capacidad de eliminar células patológicas antes de que se desarrolle la inmunidad adaptativa, conteniendo así la replicación viral o el desarrollo tumoral. Las células NK tienen distintos mecanismos de eliminación de células infectadas o tumorales que incluyen: i) la exocitosis de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzima que median la lisis celular, ii) la apoptosis inducida por la señalización a través del ligando Fas o receptores de muerte que inducen apoptosis, iii) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o ADCC (del inglés, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), desencadenada por la unión de la región constante (Fc) de los anticuerpos (Ac) IgG al receptor FcγRIIIA (CD16) característico de las células NK. Por otra parte, se ha descrito la liberación de citocinas con actividades antivirales y antitumorales por parte de estas células(14).

A diferencia de otros linfocitos, las células NK carecen de receptores específicos de Ag y lisan las células diana según interacciones inhibitorias y activadoras(14). Los principales receptores de células NK que permiten que las células NK discriminen entre lo propio y una gran variedad de estados celulares patológicos pertenecen a tres categorías principales: i) receptores de citotoxicidad natural como NKp46, NKp30, y NKp44, que pueden unirse a varios virus o tumores; ii) heterodímeros NKG2A / C / y homodímeros NKG2D, que son lectinas de tipo C que se unen al receptor del Antígeno Leucocitario Humano no clásico E (HLA-E) y ligandos inducidos por el estrés, respectivamente; y iii) los receptores de NKs similares al receptor de Ig (KIR), que reconocen moléculas de superficie HLA clase I(15),(16).

## **2.2 Inmunidad adaptativa**

La RI adaptativa está mediada por los linfocitos que se caracterizan por una elevadísima diversidad de reconocimiento antigénico. Hay dos poblaciones principales de linfocitos: linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT), que median diferentes tipos de RI adaptativas. La RI adaptativa mediada por células es llevada a cabo por los LT y la respuesta humoral es llevada a cabo por Ac(11).

La RI adaptativa se caracteriza por su especificidad y diversidad frente a distintos Ag. A diferencia de la RI innata, la RI adaptativa presenta memoria inmunológica, lo que garantiza una RI más rápida, vigorosa y con mayor afinidad en un posterior contacto con el mismo Ag(17).

### **2.2.1 Inmunidad adaptativa celular**

#### **2.2.1.1 Linfocitos T**

Los LT se originan en la MO a partir de un precursor CD34+ capaz de migrar desde MO al timo. En el timo maduran y adquieren la capacidad de responder a Ags. A medida que migran hacia zonas más internas de la corteza tímica, van avanzando en su proceso de diferenciación y maduración. En los estadios finales de maduración, pasan de la corteza tímica a la médula. Tras los procesos de selección positiva y negativa, los LT son capaces de reconocer con baja afinidad Ags propios presentados por el complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) en el caso de los LT-CD8+ o por el MHC-II en el caso de los LT-CD4+(18). Una vez que completan su desarrollo en el timo, los LT *naïve* salen a sangre periférica (SP) donde circulan por los órganos linfoides secundarios (OLS) hasta encontrar a su Ag específico(18),(19).

De hecho, durante este estadio celular coexpresan el receptor de quimiocinas CCR7 y la molécula de adhesión L-selectina o CD62L, que les permite su unión al endotelio de las venas de endotelio alto o HEV (del inglés, *High Endothelial Venules*) de los OLS y posterior extravasación hasta el interior de los mismos, donde reconocerán su Ag específico previamente procesado y presentado por una célula dendrítica(18). Además, los LT *naïve*, de forma característica, expresan en su superficie la molécula CD45RA, una isoforma de la molécula CD45 que está implicada en la transducción de la señal necesaria para su activación y diferenciación a LT de memoria, y la molécula CD27 que tiene función coestimuladora. Los LT *naïve*, cuando son activados por primera vez por el Ag correspondiente, median la RI primaria, y parte de ellos se diferenciarán en LT de memoria. Las respuestas inmunitarias secundarias se producen por encuentros posteriores con el mismo Ag y suelen ser más rápidas, de mayor magnitud y con mayor capacidad de eliminación del Ag. Ello es debido a que los LT de memoria son células de vida larga capaces de responder de manera inmediata en reexposiciones sucesivas al Ag. Dentro del conjunto de LT de memoria se pueden distinguir dos subpoblaciones con diferentes funciones, localización e inmunofenotipo: los LT de memoria central (TCM) y los LT de memoria efectora (TEM)(20).

Los LT TCM se localizan principalmente en los OLS y carecen de función efectora inmediata. Por el contrario, poseen una alta capacidad proliferativa ante una segunda exposición a su Ag específico y generan de forma eficiente LT efectores. Los LT TCM expresan marcadores de memoria tales como la isoforma CD45RO y carecen de moléculas propias de células *naïve* tales como CD45RA, pero conservan CD27 y marcadores de reclutamiento hacia los OLS, como CCR7 y CD62L(21).

Por su parte, una vez generados tras la activación de los LT *naïve*, los LT TEM abandonan los OLS, vuelven a la circulación sanguínea y migran de forma preferencial a los tejidos de la periferia para

realizar ahí su función. Para ello, dejan de expresar CCR7 en superficie y la expresión de CD62L es más heterogénea. En cambio, expresan moléculas de adhesión tales como ligandos para las selectinas P y E endoteliales además de integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  y receptores para quimiocinas inflamatorias, lo que facilita su reclutamiento hacia los tejidos inflamados(22,23). Este subtipo de LT se caracteriza por su rápida acción efectora y mayor capacidad para producir citocinas.

Finalmente, los LT TEMRA son LT de memoria efectores que se generan como consecuencia de una exposición prolongada al Ag, poseen menor capacidad efectora y de proliferación, pierden moléculas de coestimulación como CD28 y adquieren o aumentan CD57. Si la estimulación antigénica persiste, ganan con el tiempo la expresión secuencial de moléculas inhibitoras que caracterizan a los LT exhaustos como PD1, CTLA4 o LAG3(24).

Este perfil de expresión de moléculas y receptores de quimiocinas nos informa además sobre el estado de activación o la capacidad de secretar un determinado patrón de citocinas, y por tanto sobre el tipo de diferenciación que ha sufrido el linfocito tras su encuentro con el Ag. De esta manera, podemos clasificar a los LT CD4+ de memoria en Th1, Th2, Th17 y Th22, en función de la expresión diferencial de receptores de quimiocinas como CCR4, CCR5, CCR6 y CXCR3(25). Dichos linfocitos ejercen funciones diferentes a través de la síntesis diferencial de determinadas citocinas.

Otros tipos de LT CD4+ bien caracterizados incluyen los LT helper foliculares y los LT reguladores (Treg). Los primeros se diferencian a partir del LT activado por el Ag(26), se localizan en los folículos linfoides de los OLS y son esenciales en las reacciones del centro germinal, como el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y el incremento de afinidad de los LB por el Ag(27).

Los LT citotóxicos CD3+CD8+ poseen actividad citotóxica frente a células que presentan Ag en el contexto del MHC-I. Dicha citotoxicidad está mediada por la exocitosis de gránulos que liberan perforina y granzima, y/o por la unión de su receptor FAS-L al ligando FAS, que activa la ruta de las caspasas. Por cualquiera de estos dos mecanismos se induce la muerte de la célula diana(28).

Los linfocitos Treg son un subgrupo de células T, tanto T CD4+ como T CD8+, responsables de la supresión de la respuesta inmunitaria tanto en condiciones fisiológicas como patológicas(29). Son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis del SI evitando procesos autoinmunitarios, inflamatorios o alérgicos(30). Los Treg previenen la activación y la proliferación de los linfocitos T convencionales y de los linfocitos B y llevan a cabo su función supresora a través de distintos mecanismos que incluyen el contacto celular, la producción de mediadores inmunomoduladores,

como adenosina, citocinas inhibitoras como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35, el secuestro de la IL-2 y la disminución de moléculas coestimuladoras(30). Las células Treg se caracterizan por expresar el factor de transcripción FOXP3, una intensa expresión del marcador de superficie CD25 y una expresión débil o negativa del receptor de la IL-7 o CD127(30).

Los Treg pueden ser divididos en Treg tímicos (tTreg), antes conocidos como naturales (nTreg), con fenotipo CD4+CD25+CD127-(30) y CD8+CD25+CD127-(31) y Treg inducibles (iTreg), antes denominados periféricos y que presentan muy diversos fenotipos(32),(33).

Los tTreg se originan en el timo mientras que los iTreg tienen su origen en la periferia a partir de LT convencionales tras la exposición al Ag y en presencia de factores específicos como TGF- $\beta$  e IL-2(29),(30).

### 2.2.1.2 Linfocitos B

Las células B se originan de precursores linfoides en la MO y son las células productoras de Igs(34). Dependiendo de su estado de maduración, activación y diferenciación, los LB pueden localizarse en la MO, SP y OLS. Al igual que los LT, desde el punto de vista fenotípico los LB se distinguen en base a la expresión diferencial de moléculas de linaje y diferenciación, entre las que se encuentran las Ig intracelulares y de superficie, así como sus distintos isotipos.

La maduración del LB se produce en dos fases:

- La primera fase en MO es independiente del Ag. Se lleva a cabo a través de la diferenciación de una célula madre hematopoyética hasta el estadio de LB maduro *naïve*, tras los procesos de selección y pasando por los estadios de célula pro-B y pre-B. Lo más característico del linfocito pre-B es la aparición en el citoplasma de la cadena pesada  $\mu$  de las inmunoglobulinas (durante el desarrollo en la MO, la síntesis de Ig se restringe al isotipo IgM). Una vez que la célula es capaz de ensamblar de manera productiva la cadena pesada  $\mu$  y la cadena ligera (CL, kappa o lambda), expresa la IgM completa en superficie junto con el heterodímero de señalización CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$ , lo que constituye el receptor del linfocito B (BCR, *B cell receptor*), presente ya desde este estadio de linfocito B inmaduro. Las moléculas CD19, CD81 y CD21, forman el correceptor para el Ag del LB. En esta etapa, la expresión de CD20 es la característica de un linfocito B totalmente maduro, pero la célula B todavía expresa CD10 y CD38. Estos linfocitos B, denominados transicionales, se pueden detectar en SP y presentan BCR funcionales con IgM e IgD. En el estadio final de esta etapa pierden

totalmente CD10 y parcialmente CD38, presentando entonces un inmunofenotipo de linfocito B maduro *naïve* CD19+ CD20++ CD27- IgM+ IgD+.

- La segunda fase es dependiente del Ag. Consiste en la maduración, tras el contacto con el Ag, de los LB maduros *naïve* a células de memoria y plasmablastos en los OLS, como los ganglios linfáticos (GL) y el bazo (35).

Los LB *naïve* expresan en su membrana IgM e IgD, poseen características fenotípicas maduras y un receptor BCR funcional. Abandonan la MO para llegar a SP y recircular a través de OLS(36). Estos LB *naïve* cuando reconocen el Ag en los OLS, como GL, bazo o MALT, se activan, proliferan y forman centros germinales (CG) en colaboración con LT CD4+ activados, en lo que se conoce como la respuesta timo dependiente. Esta activación se produce gracias a señales coestimuladoras y a la secreción de citocinas (IL-2, IL-4 e IL-6)(37),(38).

Tras el contacto con el LT-CD4+, el LB migra al CG del folículo donde prolifera y sufre un cambio de isotipo de la cadena H de sus Igs que permite la síntesis de Acs con isotipos distintos, y un proceso de maduración de la afinidad mediante hipermutación somática de las regiones V de las cadenas H y L que aumenta la afinidad del Ac por el Ag(39),(37). Tras un proceso de selección positiva mediado por la presentación antigénica de las CD foliculares, los LB capaces de reconocer con alta afinidad el Ag abandonan el CG y se diferencian a células secretoras de Acs o CP, que migran a MO donde mantienen una larga supervivencia y su capacidad productora de Acs gracias a la interacción con el estroma medular, o a LB de memoria que circulan por la SP y son capaces de responder rápidamente mediante la secreción de Ac ante una segunda exposición a Ag. Estos LB son conocidos como LB de memoria con cambio de clase o isotipo o *Class-Switched* y expresan fenotipo CD27+IgM-IgD- (35),(40).

Existe una respuesta T-independiente frente a Ag no proteicos, en la que otro tipo de LB, los LB de memoria marginales, (CD27+IgM+IgD+), localizados principalmente en los senos marginales del bazo y en la zona marginal de los GL, responden rápidamente a Ags extraños mediante la secreción de IgM de baja afinidad (Ac naturales). Esta respuesta se produce en ausencia de LT *helper* y, por tanto, estos LB no sufren ni hipermutación somática ni cambio de clase(37),(41).

Además de los estadios mencionados, en SP se detecta una pequeña población de plasmablastos (CD27++CD38++CD138-) y CP (CD27++CD38++CD138+), que salen desde los OLS hacia MO, mucosas o tejidos inflamados(40).

### 2.2.2 Inmunidad adaptativa humoral

La inmunidad adaptativa humoral está mediada por las Ig o Acs que son proteínas que sintetizan de forma exclusiva los LB. Los Ac se pueden presentar en su forma unida a la membrana del LB, donde funciona como el receptor para el Ag, o en forma soluble, presentes en plasma y otros fluidos corporales, tejidos y mucosas. El reconocimiento del Ag por parte de la Ig de superficie activa los LB que, a su vez, sintetizarán y secretarán Acs con la misma especificidad antigénica. Los Ac en su forma soluble neutralizan los Ag e impiden la entrada y diseminación de los patógenos(11).

#### 2.2.2.1 Estructura de una inmunoglobulina

Las Igs son proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas entre sí. Pueden ser divididas funcionalmente en dominios variables que son los que unen el Ag y dominios constantes que tienen funciones efectoras específicas, como la activación del complemento, así como la fagocitosis o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo a través de su unión a receptores para la región constante (Fc) de las Igs presentes en fagocitos y células NK. Hay cinco clases de cadenas pesadas que definen los isotipos IgM, IgG, IgA, IgG e IgE(42). Cada uno de estos isotipos tiene funciones efectoras distintas en función de su capacidad para unir de forma diferencial los receptores para las Fc de las Igs.

### 3. Patogenia del mieloma múltiple

El origen de la célula tumoral del MM es una CP de MO que, tras un evento oncogénico inicial, se transforma y sufre una evolución clonal dirigida de un modo aleatorio y no lineal por eventos oncogénicos secundarios(43). El microambiente medular y el SI son también fundamentales en la progresión de esta patología, al favorecer el crecimiento tumoral y permitir que la enfermedad escape del control del último (44),(45).

#### 3.1 Célula plasmática

Las CP son células B completamente diferenciadas, sin capacidad proliferativa, especializadas en la secreción de Igs específicas de Ag. A pesar de que existen CP de supervivencia corta generadas a partir de células B preCG, las CP del MM son células B clonales posCG, de larga supervivencia, que migran hacia la MO donde establecen sus nichos de supervivencia. Las interacciones de la CP con las células estromales de la MO son fundamentales para su migración, adhesión y larga supervivencia, ya que aquellas que no migran a la MO mueren pronto por apoptosis(45).



Se cree que la transformación oncogénica en MM ocurre dentro de los OLS, ya que las CP mielomatosas presentan una alta tasa de mutaciones somáticas, lo que sugiere que el evento oncogénico se produce durante el proceso de la hipermutación somática que tiene lugar en los CG. Otra evidencia de la naturaleza posgerminal de la CPM es la naturaleza de la Ig monoclonal, ya que es mayoritariamente IgG o IgA, y rara vez IgD o IgM. Así mismo, los análisis moleculares de algunos eventos oncogénicos muestran que la mayoría de las translocaciones cromosómicas recurrentes que involucran al gen de la cadena pesada de la Ig (IgH) tienen lugar durante el proceso de cambio de clase y en menor medida durante el de mutación somática; sin embargo algunas de esas translocaciones tienen lugar en la células B pregerminales, durante la recombinación DH-JH(46).

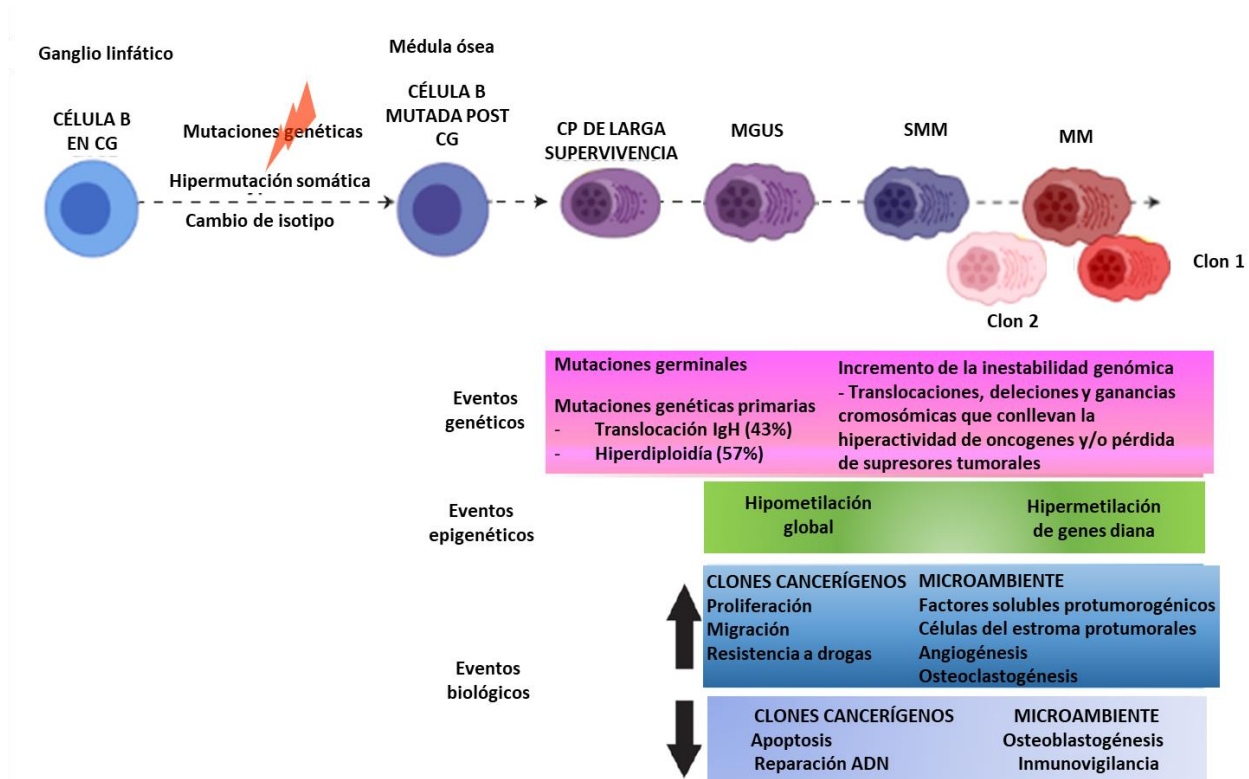
### 3.2 Eventos oncogénicos

El MM se considera una única enfermedad, sin embargo, su presentación clínica, su respuesta al tratamiento y su supervivencia son muy heterogéneas y dependientes en buena medida de las alteraciones citogenéticas subyacentes(47),(48). Dichas alteraciones genéticas se pueden dividir en primarias y secundarias. Las primarias comprenden trisomías y translocaciones. Las trisomías afectan a los cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21, dan lugar a un cariotipo hiperdiploide y producen habitualmente desregulación del oncogen MYC. Las translocaciones afectan al locus IgH en el cromosoma 14q32, que recombina con oncogenes presentes en otros cromosomas, habitualmente el 4, 6, 11, 14 y 20, lo que conlleva una mayor transcripción de los genes FGFR3 y MMSET (4p16.3), CCND1 (11q13), CCND3 (6p21), MAF (16q23) y MAFB (20q11)(49),(50),(49). Producen habitualmente desregulación de la ciclina D y generan un cariotipo hipodiploide.

Un grupo pequeño de pacientes se caracterizan por la presencia de ambas alteraciones, tanto la trisomía como la translocación IgH.

Las trisomías y las translocaciones IgH se consideran anomalías citogenéticas primarias y aparecen ya en el estadio de GMSI. Por su parte, las anomalías citogenéticas secundarias, aparecen más tardíamente, cuando la CPM se ha diferenciado completamente en una CP de vida larga; las más frecuentes son la monosomía o delección de los cromosomas 13 y 17, delección del cromosoma 1, duplicación o amplificación del cromosoma 1 (ganancia 1q), del(1p), del(17p), del(13), y diversas mutaciones en RAS y TP53, entre otras; y translocaciones secundarias que implican a MYC.

Tanto las anomalías primarias como las secundarias pueden influir en el curso de la enfermedad, en la respuesta a la terapia y en el pronóstico(51),(52),(53).



**Figura 1: Patogénesis del MM.** En la patogénesis del MM, se cree que el evento inicial ocurre en el CG, facilitado por los procesos de hipermutación somática y cambio de clase, y son característicos del clon fundador. Las mutaciones genéticas posteriores ocurren en el momento de la transformación a MM con mutaciones de *ново* durante la evolución de la enfermedad y presente de forma heterogénea en los diferentes subclones. Imagen adaptada de *Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma*(54).

### 3.3 Microambiente medular

El microambiente medular constituye un pilar fundamental en la patogénesis del MM(55). El microambiente medular incluye compartimentos no celulares como la matriz extracelular formada por laminina, fibronectina y colágeno, factores solubles como citoquinas, factores de crecimiento y quimiocinas, y el compartimento celular constituido por células hematopoyéticas (células madre hematopoyéticas, células mieloides, LT, LB, células NK) y células no hematopoyéticas como células madre mesenquimales, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales, pericitos (56).

En el MM, la supervivencia, proliferación, resistencia al tratamiento y migración de las CPM es garantizada, en buena medida, mediante interacciones llevadas a cabo entre las células tumorales y microambiente de la MO(56).

### 3.4 Exosomas

Las células cancerosas y las células del microambiente intercambian macromoléculas a través de exosomas y microvesículas(57). Diversas evidencias demuestran que los exosomas juegan un papel crucial en el microambiente tumoral del MM ya que son capaces de mediar la comunicación célula-célula a través de la transferencia selectiva de mRNA, ncRNA, proteínas y lípidos. Se ha demostrado que son capaces de promover la proliferación, farmacorresistencia, inmunosupresión, osteólisis y angiogénesis(58). También se ha postulado que los exosomas pueden transferir material genético (en particular, oncogenes) a las células tumorales, lo que sugiere un mecanismo completamente nuevo para la oncogénesis(58). En estudios recientes se está investigando a los exosomas como biomarcadores potenciales para el diagnóstico de MM y marcadores predictivos a fármacos(58).

### 3.5 Inmunidad antitumoral en MM

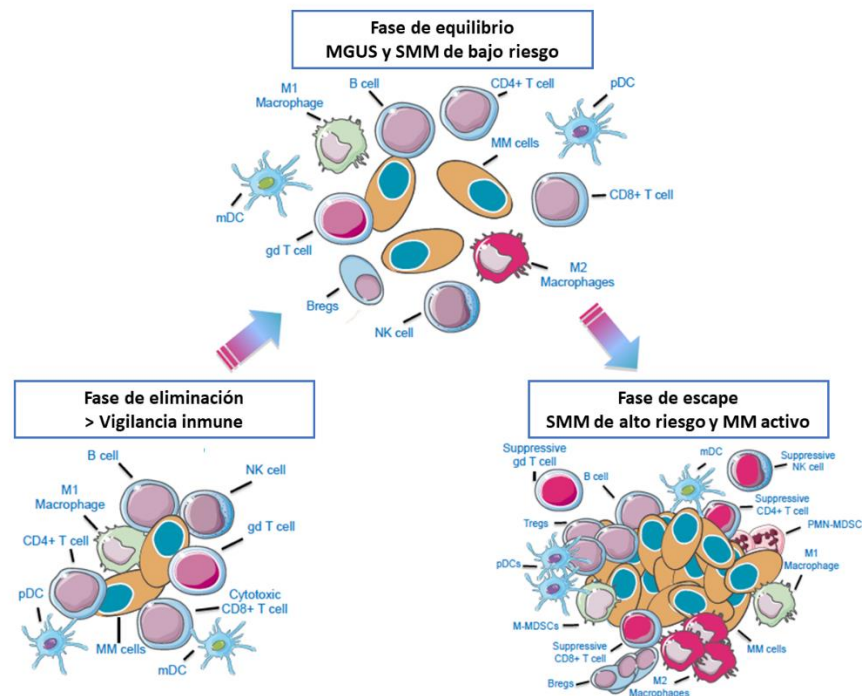
Además de las alteraciones genéticas y el microambiente tumoral, la importante desregulación inmunitaria producida por el MM también juega un papel muy relevante en la patogénesis de esta enfermedad(59),(60). Así, en el proceso conocido como inmunoedición(55), el SI parece controlar inicialmente la progresión de la enfermedad a través de un enriquecimiento en la médula ósea de LT específicos de Ags tumorales y células de memoria residentes *stem-like*, tal y como sugieren estudios realizados en pacientes con GMSI(61),(62),(63). Sin embargo, con el tiempo la disfunción del SI se hace manifiesta y el MM progresa debido a la disminución de las células arriba mencionadas, a la alteración del repertorio antigénico y a un aumento de LT exhaustos PD-1+ o anérgicos, así como de LTreg y Th17, que promueven el crecimiento tumoral (Figura 2)(64). La interacción de los LT PD1+ con su ligando PD-L1 expresado por las CPM interfiere con la proliferación de los LT y la síntesis de citocinas(65). El aumento de otros receptores inhibidores como TIGIT también se ha descrito en los LT de los pacientes con MM(65).

Además, todo indica que las células T en el MM pierden su función en el control de la progresión tumoral, debido en parte a una presentación antigénica defectuosa por parte de las CD que presentan una disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86(66),(67) y menor capacidad de migración hacia el GL(68).

Además del aumento de los LTreg, también se observa un incremento de otras células inmunosupresoras como las células supresoras mieloides (MDSC). Estas células producen anergia de los LT y las células NK a través de la secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF-

$\beta$ , entre otras moléculas. Por su parte, las CPM promueven el desarrollo y la supervivencia de las MDSCs cuyos niveles se han correlacionado con el estadio y el pronóstico(68) y regulan además la respuesta a los tratamientos convencionales y a la inmunoterapia del MM(69).

Otra población mieloide con gran capacidad supresora son los macrófagos asociados a tumor (TAM), cuyos niveles también se han asociado al pronóstico de la enfermedad, respuesta al tratamiento y supervivencia(70),(71).



**Figura 2: Inmunoedición en el microambiente de la MO del MM.** En la fase de eliminación, las CPM son reconocidas como extrañas y eliminadas por las células inmunitarias. Con el tiempo se alcanza una fase de equilibrio que implica una erradicación continua de las células del mieloma. Al mismo tiempo hay una selección de los clones más resistentes y una disminución de las células tumorales inmunogénicas. Posteriormente, en la última fase conocida como de escape esta nueva población de clones de MM que pueden evadir la inmunidad, crecerán y se expandirán. Imagen adaptada de *The immune microenvironment in multiple myeloma: Friend or foe?*(55).

Otros tipos linfocitarios con un papel antitumoral relevante son los LT y las células NK. Estos dos tipos celulares expresan receptores activadores como NKG2D que reconocen sus correspondientes ligandos en las CPM como la molécula MICA y de esta forma median citotoxicidad(72),(73). Las CPM pueden evadir la acción de las células NK en los pacientes con MM debido al mantenimiento de la

expresión del MHC-I y la pérdida de la expresión de superficie de MICA(74),(75). En las células NK de los pacientes con MM se han descrito varias alteraciones que pueden explicar su disfuncionalidad: disminución de la expresión de NKG2D, moléculas NCR y DNAM, y supresión de su actividad por parte de las Treg(73),(76),(77). Además, también se ha visto en las células NK un incremento en los marcadores de senescencia y de células exhaustas como PD-1 y su ligando PD-L1 y CTLA-4 (78).

En general, la progresión tumoral se ha asociado con niveles más bajos de expresión de NKG2D, así como NKp30 y NKp46 en células NK (79). Por su parte, NKG2A es una lectina de tipo C que media la supresión de células NK tanto en infección por VIH como en cáncer. En leucemias mieloides agudas, la falta de remisión se ha relacionado con la función deteriorada de células NK que regulan al alza NKG2A(80), mientras que su ligando HLA-E en células de MM disminuye la citotoxicidad de las células NK(81). De ahí la eficacia de un anticuerpo monoclonal (AcMo) IgG4 específico que se dirige contra NKG2A (Monalizumab)(82).

Por otro lado, la expansión de células NK NKG2C+ tras la reactivación de ciertos virus después del trasplante hematológico está asociado con una reducción de la recaída en enfermedades hematológicas (83),(84).

Los linfocitos B también están disminuidos en el MM lo que da lugar a una disminución en la producción de Ac policlonales(85). La inmunoparesia se define como una reducción por debajo del rango bajo de normalidad de los niveles de una o dos de las inmunoglobulinas no implicadas en el MM(86). La inmunoparesia es muy característica del MM, detectándose ya en la GMSI. Su presencia conlleva un pronóstico negativo de la enfermedad(85). Por su parte, el papel de los LBreg en MM ha sido poco estudiado, pero parece ser también relevante(87),(88) en el establecimiento de la inmunosupresión que caracteriza a esta neoplasia.

#### **4. Clínica y diagnóstico del mieloma múltiple**

Las manifestaciones clínicas del MM se deben a la expansión tumoral, los efectos locales y remotos de los productos tumorales y la respuesta del hospedador a la neoplasia. Cerca del 70% de los pacientes tienen dolor óseo causado por múltiples lesiones líticas. Las citocinas activadoras de los osteoclastos por parte de las células tumorales inducen una movilización sustancial del calcio, causando hipercalcemia y los síntomas derivados de este aumento. El descenso en la síntesis y el aumento del catabolismo de las Ig normales causa hipogammaglobulinemia. Estos cambios inducen susceptibilidad a las infecciones bacterianas, afectando al 75% de los pacientes en algún momento

de la evolución. La insuficiencia renal puede afectar al 25% de los enfermos y es debida a la hipercalcemia, efectos tóxicos de las CL, entre otros. Los síntomas neurológicos pueden ser resultado del aumento en la viscosidad, crioglobulinas y raras veces del depósito amiloide en los nervios. También aparece anemia en el 80% de los casos a causa de la mieloptisis e inhibición de la eritropoyesis.

El Grupo Internacional de Trabajo de Mieloma Múltiple (IMWG) actualizó en el año 2014 los criterios para el diagnóstico de MM(89). El diagnóstico de MM requiere la presencia de uno o más eventos definitorios de MM, así como la detección de un 10% de CPs clonales en MO o la detección de plasmocitoma mediante biopsia. Los eventos definitorios de MM consisten en los criterios CRAB junto a la presencia de tres biomarcadores específicos: CP clonales en MO >60, ratio de cadenas ligeras libres(CLL) en suero >100 y más de una lesión focal detectada mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (89).

Cuando existe la sospecha clínica de MM, se debe buscar la detección del componente M usando una combinación de diferentes pruebas que incluyen electroforesis de proteínas séricas, inmunofijación en suero y ensayo de CLL en suero(90). Un 2% de los pacientes con MM presentan MM no secretor y no se detecta la proteína M con las pruebas descritas previamente (91),(90).

Los estudios en MO al diagnóstico incluyen el estudio FISH para detectar t(11;14), t(4;14), t(4;16), t(14;20), trisomías del cromosoma 1 y del(17p). El cariotipo convencional para la detección de hipodiploidias y delección del cromosoma 13 tienen valor en el 30% de los pacientes con MM, acompañándose del estudio FISH (51).

La última guía clínica de IMWG propone la citometría de flujo multiparamétrica (CMF) con los estándares del grupo *EuroFlow* para la identificación de clonalidad y de CPs con inmunofenotipo (IF) aberrante(92),(93),(94),(95),(96). En condiciones normales, representan un 2-4% de las células nucleadas de la MO y los marcadores utilizados en su identificación son CD38++ y CD138+. La expresión de distintos marcadores discrimina las CP normales de las aberrantes, así, CD138 está incrementado en CP neoplásicas y CD45 y CD38 disminuidos. El fenotipo de las CP normales es heterogéneo pero la mayoría son CD19+CD20-CD27+++CD45+heterogéneoCD56-CD81+. Por el contrario, las células plasmáticas mielomatosas (CPM) suelen ser CD19-CD27débil/-CD45débil/-CD56+CD81débil/- y a menudo expresan moléculas aberrantes como CD28, CD33 y CD117.

## 5. Factores de pronósticos del MM

El MM es uno de los cánceres con mayor número de factores pronósticos descritos(97). Es por ello por lo que se pueden diferenciar distintas categorías: factores relacionados con el paciente, factores relacionados con la carga tumoral(98), factores relacionados con las características celulares intrínsecas, y factores mixtos(99).

En cuanto a los factores relacionados con el paciente, la edad es un factor crucial debido a su mayor asociación con comorbilidades, restringiendo también la elegibilidad terapéutica(100).

Entre los factores relacionados con la carga tumoral se encuentran la anemia, trombocitopenia, elevación sérica de los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina y los niveles de LDH(99).

La citogenética y las anomalías moleculares pertenecen a los factores relacionados con las características celulares intrínsecas del tumor, junto con un alto índice de proliferación de CP, y también la presencia de LCP y enfermedad extramedular (101),(102).

Algunos factores de mal pronóstico están asociados tanto al paciente como al tumor, como la hipoalbuminemia, fallo renal y la mala respuesta al tratamiento(99).

Entre todos los factores pronósticos, las anomalías genéticas y la respuesta al tratamiento son los más importantes(99). En este sentido, la EMR tiene un gran valor pronóstico ya que su ausencia de tratamiento se asocia a mayor SG.

La esperanza de vida en pacientes con MM está aumentando debido a la disponibilidad de un número creciente de nuevos agentes con diversos mecanismos de acción contra la enfermedad. Sin embargo, la enfermedad sigue siendo incurable en la mayoría de los pacientes debido a la aparición de clones resistentes, lo que lleva a recaídas repetidas de la enfermedad(103).

### 5.1 Enfermedad mínima residual

La medición de la enfermedad mínima residual (EMR) aporta valor pronóstico, añadiendo valor a otros parámetros clínicos. El nivel de EMR también permite evaluar la respuesta terapéutica, permitiendo modular la intensidad y duración del tratamiento. Por otro lado, permite detectar la aparición precoz de células neoplásicas, lo que permite utilizar terapias que son más eficaces para controlar la enfermedad que cuando la enfermedad ha recaído de forma clínica(104).

Actualmente la EMR se mide mediante CMF o mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Estos métodos, basados en el análisis de MO, pueden alcanzar una sensibilidad de identificación de una célula neoplásica entre un millón ( $10^{-6}$ )(92),(105).

En la era de los nuevos agentes terapéuticos para el MM que logran tasas elevadas de remisión completa (RC), la negatividad de EMR postratamiento es un factor predictor de SLP y globales prolongadas. La detección de EMR podría ser utilizada como un biomarcador para evaluar la eficacia terapéutica en diferentes etapas de enfermedad (inducción, trasplante, consolidación, mantenimiento, recaída) y tal vez adaptar la terapia según cada caso en particular. Además, podría considerarse como subrogante de SG en el diseño de estudios clínicos(106).

La extensión de la enfermedad ósea se evalúa por imagen mediante tomografía de emisión de positrones (PET), RMN o TC a bajas dosis(51).

## **6. Sistema de estadiaje del Mieloma múltiple**

El estadiaje indica la extensión del MM, la carga tumoral y sus posibles complicaciones. El sistema más empleado es el de Durie y Salmón, que incluye entre sus parámetros los niveles de calcio sérico, hemoglobina y la cuantificación del CM y clasifica al MM en tres estadios. A pesar de su utilidad, este sistema de estadiaje no tiene en cuenta algunos factores importantes como la  $\beta$ 2-microglobulina. Por ello, se ha desarrollado un nuevo sistema internacional de estadiaje, el índice Pronóstico Internacional para Mieloma (ISS), que se trata de un índice de pronóstico en el que se incluyen dos parámetros: la  $\beta$ 2-microglobulina y la albúmina. En función de si los dos son normales, y uno o los dos anormales se clasifican en I, II y III.

En el año 2015 se propuso un modelo de estratificación de riesgo revisado más eficiente (R-ISS) que combina el sistema ISS con las alteraciones cromosómicas del (17p), t(4;14) y t(14;16) y con los niveles de LDH, permitiendo establecer subgrupos de pacientes según su riesgo(107),(108),(109):

## **7. Tratamiento del mieloma múltiple**

La supervivencia frente al MM ha mejorado significativamente en los últimos 15 años(110). La introducción de los agentes noveles como la talidomida(111), el bortezomib (112) y la lenalidomida han contribuido a ello(113). En la última década la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado fármacos como el carfilzomib, pomalidomida, panobinostat, ixazomin, elotuzumab, daratumumab,



isatuximib y selinexor para el tratamiento del MM en recaída que prometen mejorar aún más estos resultados(51).

En el tratamiento del MM se han usado numerosas combinaciones de drogas, con mecanismos de acción conocidos y en algunos casos aún desconocidos. La talidomida, lenalidomida y pomalamida son agentes IMiDs que actúan activando la ligasa E3(114). Esto provoca la degradación de dos factores de transcripción específicos de células B. Además de esta actividad también esta descrita su capacidad antiangiogénica(51).

El bortezomib, carfilzomib y ixazomib son inhibidores del proteasoma(115). El elotuzumab tiene como diana a SLAMF7, CD38 es la diana tanto del daratumumab como del isatuximab y el panobinostat actúa como un inhibidor de acetilasa(51).

### **7.1 Tratamiento de inducción en pacientes candidatos a trasplante autólogo.**

Por lo general, los pacientes se tratan con varios ciclos de terapia de inducción antes de la recolección de las células stem. Después de la recolección los pacientes pueden someterse a TASPE o reanudar la terapia de inducción retrasando el TASPE(116). Hay muchas opciones de terapia de inducción: triple régimen con bortezomib, lenalidomida y dexametasona (VRd)(117), régimen cuádruple con daratumumab, bortezomib, talidomida y dexametasona (Dara-VTd)(118) y combinaciones de múltiples drogas que incluyen bortezomib, doxorubicin, dexametasona (PAD) o combinaciones de distintos agentes con regímenes de quimioterapia como VDT-PACE (bortezomib, dexametasona, talidomida, cisplatino, doxorubicin, ciclofosfamida y etiposido). Estos últimos regímenes son especialmente útiles en pacientes con MM más agresivos, como en la LCP o en plasmacitomas extramedulares(119),(120),(121). Las últimas guías recomiendan la combinación de fármacos con distinto mecanismo de acción como tratamiento de inducción, incluyendo inhibidores del proteasoma e IMiDs.

### **7.2 Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.**

El TASPE mejora la mediana de la SG en el MM en aproximadamente 12 meses(51). Tras el tercer ciclo de inducción (aunque dependiente del paciente y disponibilidad) se procede a la movilización de los progenitores hematopoyéticos, que se realiza en general con la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) durante 4 días. Posteriormente, se recoge mediante aféresis un producto mínimo de  $2 \times 10^6$ /kg células CD34+ para la realización del trasplante.

El trasplante comprende desde el ingreso del paciente hasta la infusión de los progenitores hematopoyéticos. El objetivo es acondicionar la MO y eliminar las células cancerosas persistentes. El tratamiento con melfalán intravenoso a altas dosis (200mg/m<sup>2</sup>; Mel200) es el régimen más utilizado. Una descripción más detallada está disponible en diversos manuales y guías del Grupo Español de trasplante de progenitores hematopoyéticos ([www.getg.es](http://www.getg.es)).

### **7.3 Tratamiento de consolidación postrasplante autólogo**

La terapia de consolidación es el término con el que se denomina a la administración de una terapia de corta duración, normalmente con dos o más drogas, previo al tratamiento de mantenimiento. Los últimos estudios indican que la administración de ciclos adicionales de quimioterapia con VRd como terapia de consolidación postTASPE no aporta beneficio. Es por ello que se desaconseja la terapia de consolidación y se recomienda el inicio de la terapia de mantenimiento estándar de baja intensidad postTASPE(122).

### **7.4 Tratamiento de mantenimiento postrasplante autólogo**

El tratamiento de mantenimiento está indicado a continuación del TASPE para retrasar la aparición de la EMR. La lenalidomida forma parte del tratamiento estándar(123),(124),(125). En el caso de pacientes de alto riesgo, como los portadores de del(17p)(126), el tratamiento de mantenimiento con bortezomib ha mostrado buenos resultados. En pacientes que no toleren bien el bortezomib, el ixazomib es una buena alternativa(127).

### **7.5 Nuevas terapias: Inmunoterapia T-CAR**

Hay nuevas terapias en investigación que son prometedoras. Una de las opciones más interesantes incluye el uso de células T-CAR. Las células T-CAR son células T autólogas modificadas genéticamente *ex vivo* para expresar un nuevo receptor que contenga un dominio extracelular de unión al Ag de interés y mantener el dominio intracelular que traduce la señal de activación(128). Seleccionar el Ag de interés contra el tumor es el paso más crucial cuando se trata de terapia con células T-CAR, debido a la diversidad de los posibles Ags dirigibles. Los objetivos inicialmente elegidos en el caso del MM fueron CD138, la cadena ligera kappa y CD19(129). Existen múltiples ensayos clínicos activos contra diversas moléculas como BCMA ( antígeno de maduración de células B) que es una proteína expresada por las CPM, con resultados esperanzadores(130),(131).

## **8. Respuesta al tratamiento en mieloma múltiple**

Hasta hace poco los criterios de respuesta más usados eran los del *European Blood and Marrow Transplant* (EBMTR) (132). Se han creado una nueva categoría de respuesta completa, denominada respuesta completa estricta, y la categoría muy buena respuesta parcial o respuesta casi completa, y se ha eliminado la respuesta mínima, equiparándola con la enfermedad estable.

Dentro de la categoría de remisión completa estricta (RCe) se incluye a aquellos pacientes con RC, FLC normal y ausencia de células clonales en MO. En la categoría de remisión completa (RC) se incluye a aquellos pacientes con IFJ negativa tanto en suero como en orina, ausencia de plasmocitomas y con una proporción de CPs en MO <5%. En la categoría de pacientes con muy buena respuesta parcial (MBRP) se detecta CM en suero y en orina por IFJ, pero no en la electroforesis. La categoría remisión parcial (RP) engloba aquellos pacientes en los que se reduce al 50% el CM en suero y al 90% la proteína monoclonal en orina. Se denomina enfermedad estable cuando no se cumplen criterios de RC, MBRP o RP.

## **9. Reconstitución inmunitaria postTASPE**

La reconstitución del SI después del trasplante es un proceso dinámico. Comienza con la reconstitución del SI innato dentro de las primeras semanas tras el trasplante y es seguido de la recuperación del SI adaptativo que puede tardar 2 años o más en hacerlo por completo(133).

La aparición de granulocitos, monocitos, CD y células NK marcan el inicio de la recuperación celular. El uso de factores de crecimiento, no solo mejora el injerto de granulocitos y monocitos, sino que mejora su función(137).

La reconstitución inmunitaria se correlaciona con mejores resultados postrasplante, lo que sugiere que su calidad de la reconstitución inmunitaria afecta al control de la enfermedad a largo plazo(138),(139),(140),(141),(142). En los siguientes apartados nos centraremos sobre todo en el conocimiento actual de la reconstitución inmunitaria postTASPE, que probablemente difiere o tiene matices diferentes a la reconstitución postrasplante alogénico.

### **9.1 Reconstitución de células NK**

La reconstitución temprana de las células NK tras el TASPE es un factor protector frente a las recaídas(16). La mayor parte de los estudios realizados en adultos establecen que la reconstitución celular se inicia con una rápida recuperación de las células NK, que tiene lugar en los 100 primeros días postTASPE(143). Sin embargo, estas células NK que predominan durante el periodo

postrasplante tienen características fenotípicas y funcionales de inmadurez (144). Así, en los primeros 6 meses tras el trasplante se produce un incremento de las células NKs CD56brightCD16-, que en los sucesivos meses madurarán hasta CD56dimCD16+(84).

### 9.2 Reconstitución de linfocitos B

Después del trasplante, el porcentaje de LB alcanza los niveles de normalidad a los 3 meses, sin embargo, los valores absolutos pueden tardar 6-12 meses hasta normalizarse(145),(146).

A pesar de que los LB se reconstituyen durante el primer año, la distribución de las distintas subpoblaciones de LB en SP difiere de la que encontramos en un adulto sano, caracterizándose por un predominio de LB transicionales y *naïve*(147),(148),(137). Una excepción a lo descrito se ha visto en pacientes con reactivación del virus de Epstein-Barr tras el trasplante, en los que se detecta un aumento de los LB de memoria con cambio de clase(147). En otras enfermedades en las que como tratamiento también se aplicó TASPE también se ha descrito el aumento de LB *naïve* y transicionales en el primer año tras el trasplante(149).

Por tanto, la reconstitución de los LB sigue la ontogenia normal y la recuperación de la competencia funcional de los LB tras el trasplante requiere de varios meses o años (150). Así, en los primeros meses tras el trasplante, los LB no son capaces de proliferar ni de diferenciar en presencia de Ag específicos, lo que indica su incompetencia funcional(137).

La recuperación de los niveles normales de LB coincide con la recuperación también de los niveles de IgM, que se normaliza a los 3 meses. Se pueden detectar células B de memoria que producen IgG entre los 3-6 meses, cuyos niveles permanecen Ig bajos durante el primer año. La última Ig en recuperarse es la IgA, que puede ser indetectable durante varios años(150),(151),(152),(137). Lo anterior hace destacar el hecho de que la falta de recuperación de estas células no permite reconstituir los Ac, incrementando el riesgo de infecciones.

### 9.3 Reconstitución de linfocitos T

A pesar de que la función tímica disminuye con la edad debido a la involución de este órgano, se sigue encontrando una actividad residual en adultos. Además, cuando tiene lugar una pérdida masiva de LT, como en el caso del TASPE, aumenta la actividad tímica, independientemente de la edad(153).

En estudios previos se ha observado que la recuperación de los LT tras altas dosis de quimioterapia y TASPE puede tardar de 4 a 6 años(154), y en el caso de trasplante alogénico entre 4 y 6(155). Sin duda, la intensidad del tratamiento citotóxico es un factor importante que influye en la reconstitución de las células T. En el caso del alotrasplante se ha demostrado que los regímenes de acondicionamiento de menor intensidad mejoran la reconstitución de los LT *naïve*(153).

Después del TASPE, las células T permanecen disminuidas incluso después de haberse normalizado el número de linfocitos totales. Esto se caracteriza por un repertorio restringido del TCR y como consecuencia, una disminución de la capacidad del SI para responder a patógenos. La recuperación de las células T con un amplio repertorio del TCR es un proceso largo y depende del régimen de la producción tímica. Se ha visto que después de un año el repertorio sigue siendo bajo, y esta disminución depende del tratamiento de acondicionamiento aplicado(153).

Después del trasplante la reconstitución de los LT sigue dos vías: la vía dependiente del timo y la vía extra-tímica. Mientras que la proliferación periférica de LT protege al huésped temporalmente contra infecciones, la producción tímica de LT *naïve* proporciona protección inmunitaria contra un amplio espectro de Ag(153). Debido a que la timopoyesis después del trasplante es muy lenta, la recuperación de todo el repertorio de células T permanece incompleta durante años(154).

La timopoyesis, el número de LT *naïve* y la diversidad del repertorio es dependiente de la edad del paciente, siendo significativamente menor en pacientes mayores de 40-50 años debido a la involución del timo(154).

Como consecuencia de los defectos en la vía dependiente del timo, los pacientes trasplantados se caracterizan por una reconstitución defectuosa de las LT-CD4+. En concreto, en pacientes con otras enfermedades hematológicas se ha descrito que la recuperación numérica de los LT-CD4+ nunca llega a ser completa postTASPE(156).

La recuperación de la timopoyesis y la consiguiente generación de LT *naïve* permitirá aumentar el repertorio T con una mayor diversidad del TCR(150). La reconstitución de la subpoblación de los LT *naïve* también dependen de un timo funcional para su reconstitución, es por ello por lo que estos pacientes se caracterizan por una expansión periférica de LT de memoria.

Los LT-CD8+, al provenir de la vía extra-tímica se reconstituyen en los primeros meses(143), dando lugar a la inversión del cociente CD4/CD8(137),(157).

En cuanto a la proliferación de LT tras el trasplante, se ha observado ausencia de proliferación en estas células en el 20-50% de los pacientes hasta después de un año del trasplante(137).

## 10. Nuevos biomarcadores en mieloma múltiple

La utilidad de los marcadores tradicionales que se utilizan en el diagnóstico y pronóstico del MM es limitada, lo que ha propiciado la identificación de nuevos biomarcadores con mayor capacidad predictiva(158). Los marcadores de nueva generación se centran en la identificación de parámetros que están alterados en esta enfermedad como: i) Componentes de la matriz extracelular: proteínas como la laminina-1, fibulinas y versican (VCAN) están siendo estudiadas por su posible potencial como marcadores de diagnóstico, pronóstico y como posibles dianas terapéuticas(158); ii) Marcadores de angiogénesis: en el caso del MM se ha demostrado que la inhibición de VEGF *in vitro* con bevacizumab tiene efecto citostático(159); iii) Telómeros y telomerasa: la división celular tiene como consecuencia un acortamiento de los telómeros. El inhibidor de la telomerasa ha dado resultados positivos *in vitro* en líneas celulares de MM (160); iv) Células tumorales circulantes: la detección de CPM en SP ayuda en la detección de las recaídas, prediciendo una menor SG(161); v) miRNAs: se ha estudiado el papel antitumoral de miR-30d a través de la inhibición de la vía PI3K/Akt, y se ha propuesto como un tratamiento para el MM. También se ha demostrado la capacidad supresora de tumores del miR-26b-5p por su capacidad de suprimir la proliferación celular y también se ha propuesto como posible terapia para el MM(158); vi) ADN libre circulante o cfDNA (del inglés *circulating free DNA*): el cfDNA se libera de las células tumorales y por tanto, contiene las mutaciones presentes en las células tumorales primarias. El análisis de cfDNA de pacientes con MM demostró que los pacientes con un nivel más alto de cfDNA tenían una menor SG y que la disminución de los niveles de cfDNA después del tratamiento con quimioterapia se asociaban con una mayor SLP. El cfDNA podría ser una alternativa al análisis invasivo de MO(162); vii) Marcadores proteómicos: las proteínas asociadas con la función del proteasoma como PSME1, PSME2, HSP90, entre otras, están inhibidas en pacientes con MM refractario en comparación con pacientes con buena respuesta al tratamiento(158); viii) Marcadores genómicos: la presencia de hipo o hiperploidía se ha asociado con una menor SLP. Por otro lado, diversas mutaciones y SNPs se están estudiando por estudios de asociación del genoma completo o GWAS (del inglés *genome-wide association study*)(158).

### 10.1 Biomarcadores del sistema inmunitario

Dentro de los posibles biomarcadores de respuesta al TASPE destaca la reconstitución inmunitaria. Sin embargo, los estudios llevados a cabo en este sentido son en general heterogéneos y con un reducido número de pacientes. En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo, se caracterizó el perfil inmunitario en SP de los pacientes de MM postTASPE en RC de larga duración (LTCR, del inglés, *long term complete remission*)(86), con el fin de identificar aquellas características de la reconstitución inmunitaria potencialmente asociadas a una buena vigilancia por parte del SI. El inmunofenotipo de estos pacientes se caracteriza por un incremento en el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ efectoras junto con una disminución de LT *naïve*, manteniéndose los niveles de células Treg. Presentan, además, una redistribución de los receptores de activación e inhibición de las células NKs, con una disminución de los niveles de receptores de activación como NKp46 y un incremento de los receptores de inhibición como NKG2A. Con respecto a los LB, se halló un aumento de la proporción de los LB *naïve* junto con una disminución de LB marginales y memoria con cambio de clase, lo que sugería una correcta reconstitución de la inmunidad humoral, sin inmunoparesia.

Sin embargo, dicho estudio no discernía si este inmunofenotipo característico de los pacientes LTCR era un biomarcador predictor de remisión o buen pronóstico, o por el contrario era algo intrínseco al TASPE que tiene lugar en todos los pacientes trasplantados.

Esta tesis pretende resolver esta duda, así como identificar nuevos biomarcadores tanto de diagnóstico de esta enfermedad como de recaída, derivados estos últimos del estudio de la reconstitución inmunitaria postTASPE.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **1. HIPÓTESIS**

- 1) Los pacientes con MM poseen un perfil inmunitario característico que les diferencia de los sujetos sanos.
- 2) La composición del producto de las aféresis extraídas de los pacientes con MM tras tratamiento de inducción condiciona la reconstitución inmunitaria temprana.
- 3) Los pacientes con MM postTASPE que se mantienen en remisión completa alcanzan una reconstitución inmunitaria similar a la que caracteriza a los pacientes en remisión completa de larga duración (LTCR).
- 4) La reconstitución inmunitaria de los pacientes con MM que recaen en los 2 primeros años postTASPE es diferente de los que no recaen.

## **2. OBJETIVOS**

- 1) Comparar los valores de las distintas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica de los pacientes con diagnóstico reciente de MM con los de sujetos sanos.
- 2) Comparar las proporciones de las distintas subpoblaciones linfocitarias de las aféresis de pacientes de MM con las de sangre periférica en el mes 3 postTASPE.
- 3) Caracterizar la reconstitución inmunitaria postTASPE en pacientes con MM.
- 4) Comparar la reconstitución inmunitaria postTASPE entre pacientes que recaerán y aquellos que permanecerán en remisión completa.
- 5) Estudiar el papel de la reconstitución inmunitaria como factor protector de recaída.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

## **1. Pacientes**

### **1.1 Evaluación del perfil inmunitario en pacientes con mieloma múltiple de diagnóstico reciente, aféresis, MM posTASPE, MM-LTCR y recaídas.**

Con el fin de evaluar si existe un inmunofenotipo que diferencie a los pacientes de diagnóstico reciente de MM de los sujetos sanos, se incluyeron 20 pacientes que fueron diagnosticados de MM en el Hospital Universitario de la Princesa.

Posteriormente, con el fin de determinar si este perfil inmunitario en pacientes de diagnóstico reciente se mantiene en las aféresis y, por lo tanto, condiciona la reconstitución del TASPE, se recolectaron 28 aféresis.

Para estudiar la reconstitución inmune posTASPE, se estudiaron 31 pacientes desde el mes 3 posTASPE al mes 24, realizando el seguimiento con inmunofenotipo cada 3 meses. Los pacientes fueron diagnosticados, tratados y trasplantados en el Hospital Universitario de la Princesa entre los años 2015-2020.

Finalmente, se realizó el análisis de 16 pacientes con MM en remisión durante seis años posTASPE (grupo LTCR), ya analizados en estudios previos realizados por nuestro grupo. Los pacientes fueron reclutados aleatoriamente en distintos tiempos postrasplante y sin evidencia de enfermedad autoinmune. Todos los pacientes fueron diagnosticados, trasplantados y tratados en el Hospital Universitario de la Princesa durante los años 1995 y 2012.

Como controles se incluyeron 25 donantes sanos, tantos hombres como mujeres.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético (CEIC) del Hospital Universitario de la Princesa. Todos los pacientes fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado correspondiente.

## **2. Muestras**

En los pacientes de diagnóstico reciente de MM, aféresis, LTCR, MM posTASPE y controles se obtuvieron dos muestras de SP en dos tubos de SP de 5 mL con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético). Una de ellas se transportó a temperatura ( $T^a$ ) ambiente al laboratorio de Análisis Clínicos y la otra, en las mismas condiciones, al laboratorio de Inmunología del Hospital de la Princesa. Si las muestras no se analizaban de inmediato, se guardaban a 4°C durante un máximo de 24 horas.

En la misma extracción, se obtuvo una muestra de SP en un tubo de 10 mL sin anticoagulante que se centrifugó durante 2 minutos a 2000g para la obtención de suero. Se alicuotó, identificó y guardó el suero de cada paciente en un congelador de -80°C. Este mismo procedimiento se llevó a cabo periódicamente desde el tercer mes del TASPE hasta la recaída o hasta la finalización del estudio en los pacientes con MM trasplantados en seguimiento.

Con el fin de confirmar el estado de RC en los 16 pacientes MM-LTCR se llevó a cabo un estudio de EMR mediante CMF y citología. Tras la firma del consentimiento informado, se realizó una punción lumbar y se transfirió la muestra de la MO a dos tubos con EDTA en una proporción 2:10 (0.2 mL de EDTA por cada mL de MO). Igual que con las muestras de SP, una de las muestras se transportó a Tª ambiente al laboratorio de Hematología; la otra muestra se envió, en las mismas condiciones, al laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa. Si no se analizaban inmediatamente, las muestras se guardaban a 4°C durante no más de 24 horas.

### 3. Materiales

#### 3.1 Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo

El panel de AcMo utilizados para estudio del inmunofenotipo en SP y MO se muestra en la tabla 1.

<u>Sangre periférica</u>	<u>FITC</u>	<u>PE</u>	<u>PerCP</u>	<u>PECy7</u>	<u>APC</u>	<u>APC-H7</u>	<u>PB</u>
<b>Tubo linfocitos T (Clon)</b>	CD45RA (H100)	CD8 (OX-8)	-	CD3 (SK7)	CD27 (MT271)	CD4 (SK3)	CCR7 (150503)
<b>Tubo NK (Clon)</b>	NKG2C (134591)	NKp46 (9E2)	CD3 (SK7)	NKG2D (1D11)	NKG2A (REA-110)	CD8 (SKI)	CD56 (B159)
<b>Tubo linfocitos B (Clon)</b>	IgD (IA6-2)	CD27 (L128)	CD38 (HIT2)	CD19 (SJ25CI)	IgM (G20-127)	CD10 (H110a)	CD20 (2H7)
<b>Tubo Treg (Clon)</b>	-	CD25 (M-A251)	CD8 (53-6.7)	-	CD127 (Hil-7R-M21)	CD3 (UCHT1)	CD4 (RPA-T4)
<b>Tubo Texh (Clon)</b>	CD57 (HNK-1)	CD279 (MIH4)	-	-	CD28 (CD28.2)	CD3 (UCHT1)	CD4 (RPA-T4)

**Tabla 1: Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de sangre periférica.** Estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica en sangre periférica. Entre paréntesis se indica el clon de anticuerpo utilizado.

Todos los AcMo fueron suministrados por Becton Dickinson (NJ, USA) salvo: NKG2C y NKG2A.

## 4. Métodos

### 4.1 Hemograma

En las muestras de 5 mL de SP con EDTA enviadas al laboratorio de Hematología y durante las 24 horas siguientes a la extracción, se realizó el hemograma mediante el contador automático Sysmex XT 1800i (Roche, Basilea, Suiza). El estudio incluyó el análisis de la serie eritroide (hemoglobina (g/dL), número de hematíes (millones/mm<sup>3</sup>) y volumen corpuscular medio (fl), el análisis de la serie leucocitaria (miles/mm<sup>3</sup>, con su correspondiente fórmula leucocitaria) y el análisis de la serie plaquetar (miles/mm<sup>3</sup>).

### 4.2 Inmunofenotipo en sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica.

En las 24 horas siguientes a la extracción, se analizó el IF de las muestras de SP enviadas al laboratorio de Inmunología del Hospital de la Princesa. Con la combinación de AcMo que se describe en la tabla 1, se analizaron las subpoblaciones de LT, LB, Texh, Treg y células NK mediante CMF de ocho colores en el citómetro FACSCanto (Becton Dickinson, USA), previamente calibrado y compensado. La calibración del equipo se realiza empleando distintos tipos de microesferas y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la compensación del equipo se utiliza una muestra de SP marcada con las combinaciones de AcMo marcados en las fluorescencias indicadas en la tabla 1, y se ajustan las señales de fluorescencia y voltajes de cada detector con el fin de asegurar una discriminación adecuada entre las señales positivas y negativas.

Para cada tubo de SP se adquirieron 100.000 células totales según la ventana (o del inglés *gate*) tamaño/complejidad, salvo para el tubo Treg en el que se adquirieron 1.000.000 de células totales. En aquellos casos en los que una o más subpoblaciones linfocitarias eran muy escasas se procedió a continuar con la adquisición de la muestra hasta alcanzar un mínimo de 20 células en todas las subpoblaciones.

#### 4.2.1 Preparación de la muestra de sangre periférica

A partir de 150 µl de SP, se añadió la combinación de AcMo correspondiente a cada tubo, y se incubó durante 15 minutos en agitación. Tras la incubación, se añadieron 1.5 mL de solución lisante para romper los eritrocitos de la muestra y se incubó de nuevo en agitación durante 10 minutos a Tª ambiente. Tras el lisado, se realizó un lavado con PBS en cada tubo, y tras el último lavado, se resuspendió el pellet de células en 200 µl de PBS quedando así la muestra preparada para ser analizada por el citómetro. Para el marcaje del tubo LB, previo a la incubación con los AcMo, se

realizaron dos lavados con 1ml de PBS cada vez. Los volúmenes de AcMo se establecieron en base a los resultados de estudios previos de titulación.

#### 4.2.2 Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

En el siguiente cuadro se muestran los valores de normalidad de las distintas subpoblaciones linfocitarias en SP en sujetos adultos sanos, siendo el rango de normalidad de los valores absolutos de linfocitos totales de 1.000-4.000 linfocitos/ $\mu$ l de SP.

Subpoblaciones linfocitarias en SP	Porcentaje (%)	Valores absolutos (células/ $\mu$ l)
LT-CD4 <sup>+</sup>	35-55	400-1.500
LT-CD8 <sup>+</sup>	10-30	200-1.100
LB	5-15	200-600
Células NK	5-20	150-900

Definimos las distintas subpoblaciones linfocitarias con las siguientes combinaciones de AcMo:

#### Linfocitos T:

LT	LT <i>naïve</i>	LT memoria central	LT memoria efectores CD45RA <sup>-</sup>	LT memoria efectores CD45RA <sup>+</sup>	Linfocitos Texh
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup>	CD27 <sup>-</sup>	CD57 <sup>+</sup>
O	CCR7 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>-</sup>	CCR7 <sup>-</sup>	CD279 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD45RA <sup>+</sup>	CD45RA <sup>-</sup>	CD45RA <sup>-</sup>	CD45RA <sup>+</sup>	

#### Linfocitos T reguladores:

Linfocitos Treg	LT naturales
CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>
CD25 <sup>++</sup>	CD127 <sup>-</sup>

**Linfocitos B:**

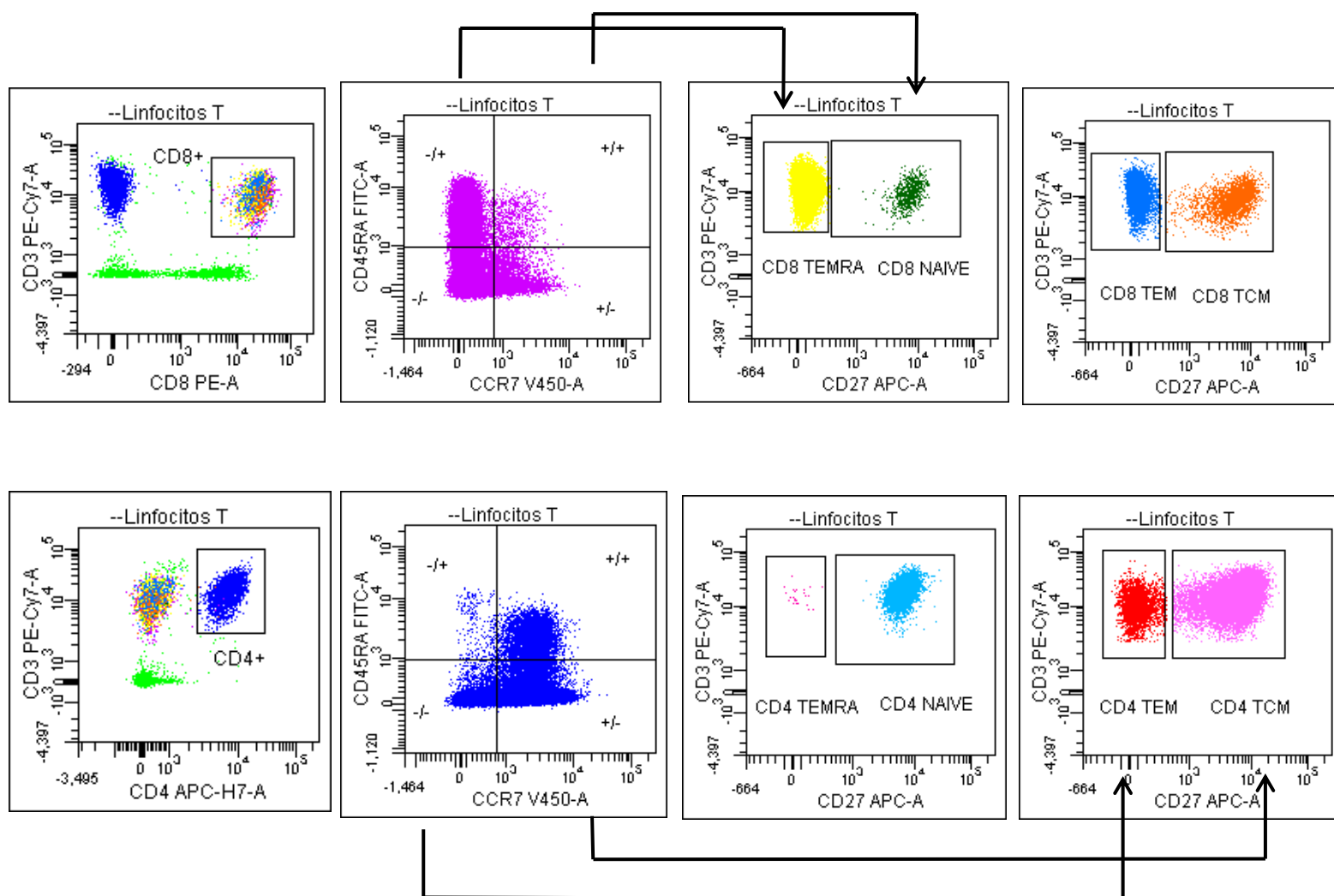
LB	LB <i>naïve</i>	LB memoria con cambio de clase	LB marginales	LB transicionales	Plasmablastos
CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>	CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	CD10 <sup>-</sup> CD10 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>-</sup> CD27 <sup>++</sup> CD38 <sup>++</sup>

**Células NK:**

Se definen como CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y se analiza la expresión de los siguientes receptores de membrana: NKG2A, NKG2C, NKp46 y NKG2D.

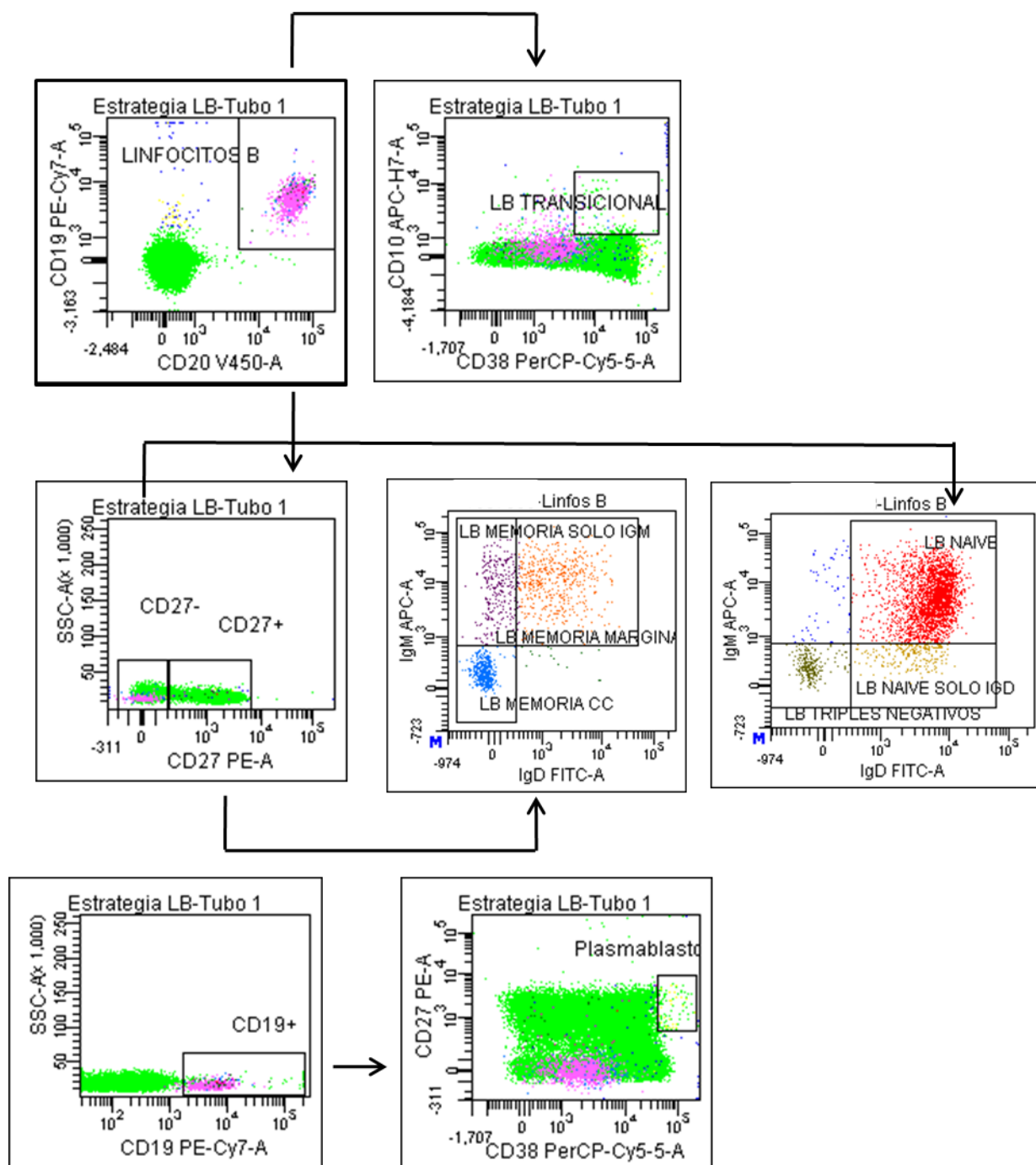
El análisis de las distintas subpoblaciones linfocitarias en SP se realizó utilizando el programa de software DIVA (Becton Dickinson, USA). Para cada tubo, se generaron unas plantillas sobre las que se crearon los gráficos de puntos que nos permitieron seleccionar las distintas subpoblaciones linfocitarias mediante *gates*.

En las figuras 3, 4, 5, 6 y 7 se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de análisis de LT, LB, Texh, NK y Treg respectivamente, utilizando el programa DIVA, en un paciente trasplantado de MM elegido aleatoriamente.

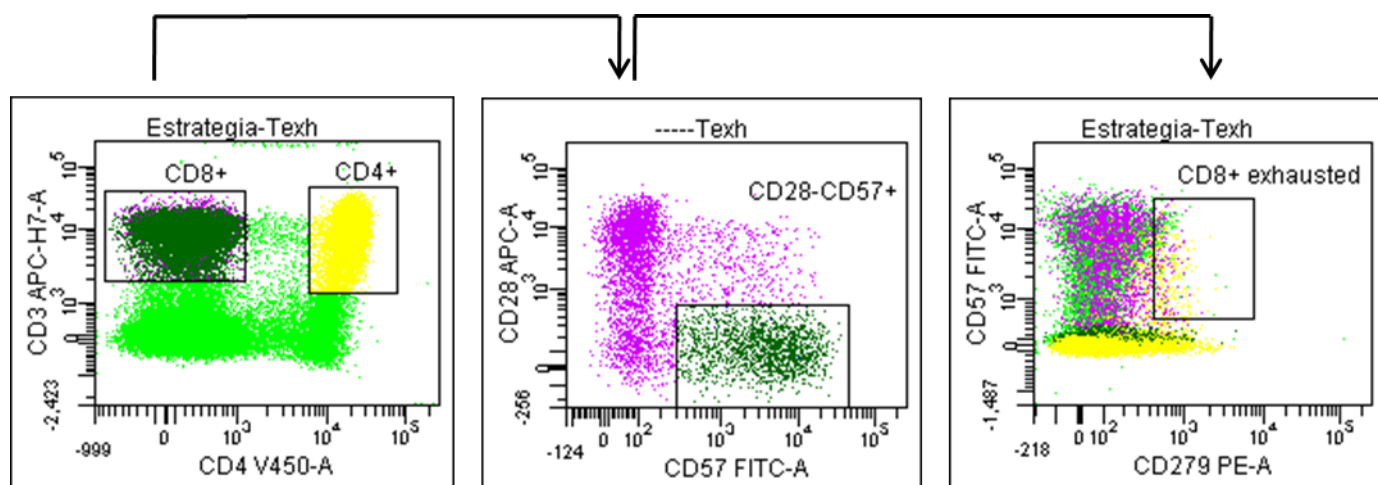


**Figura 3: Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.** Subpoblaciones de LT-CD4+ y LT-CD8+. Análisis realizado mediante el programa DIVA.

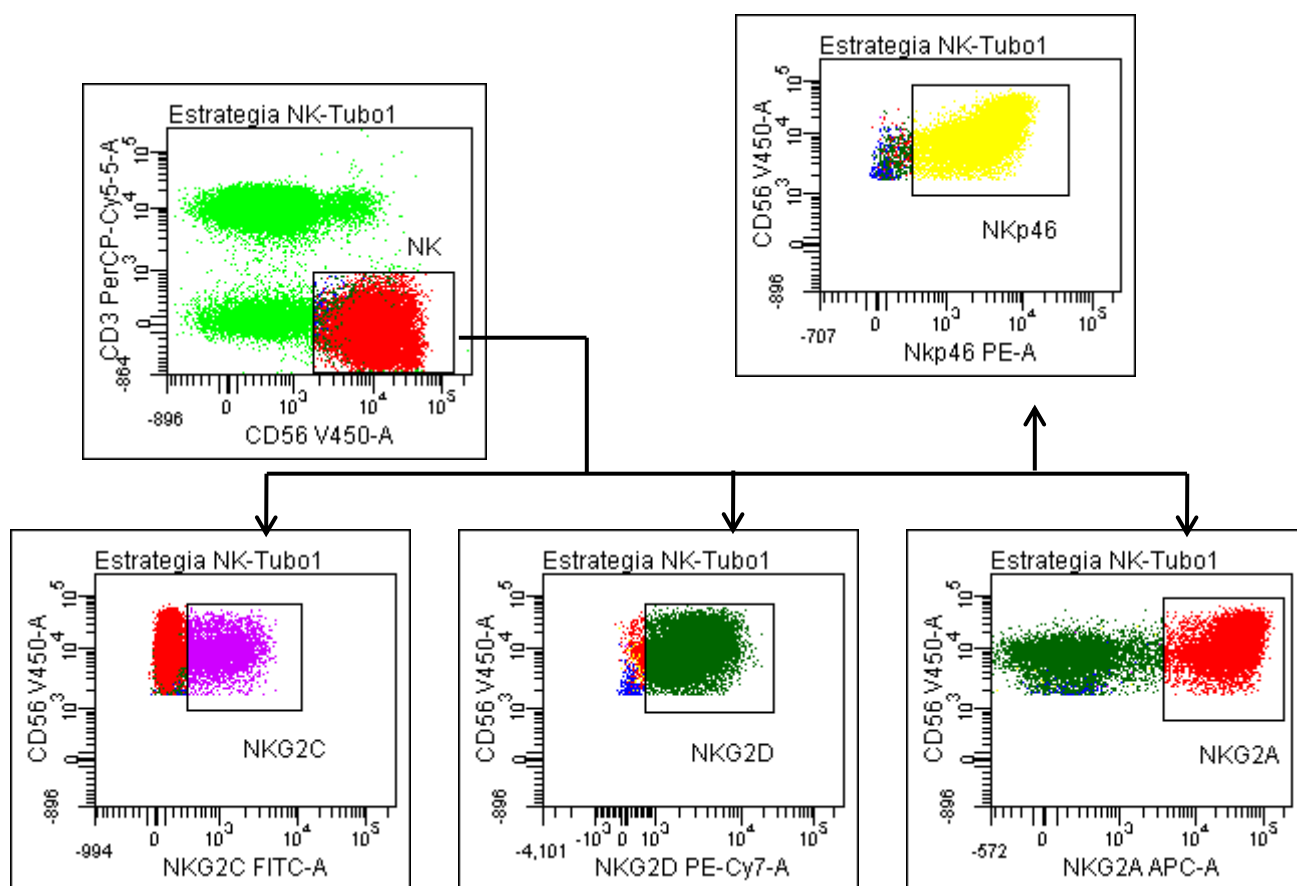




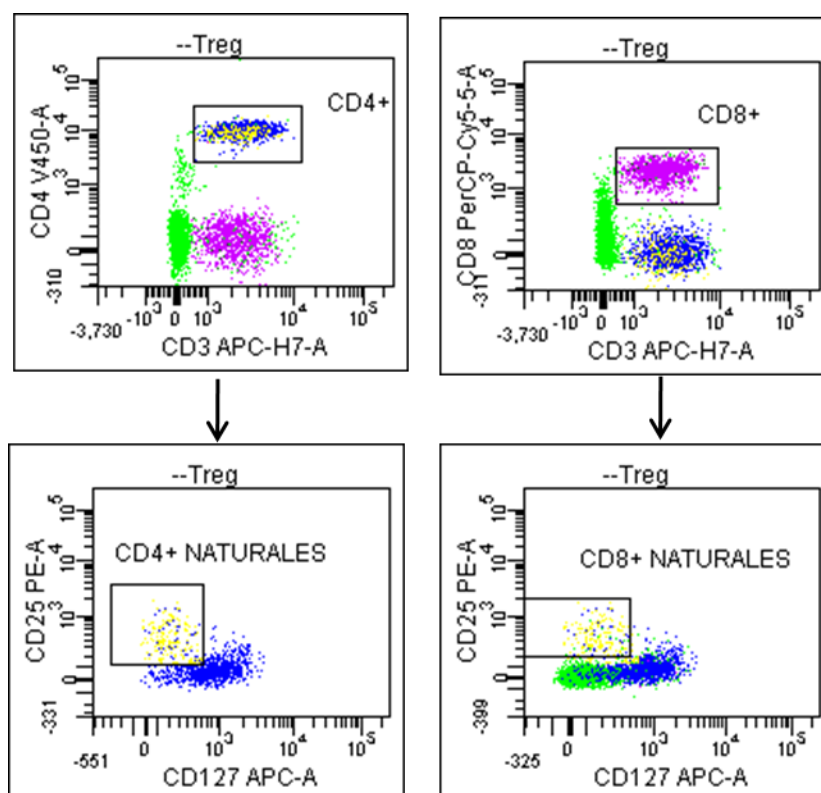
**Figura4:** Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. Subpoblaciones de linfocitos B. Análisis realizado mediante el programa DIVA.



**Figura 5: Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.** Subpoblaciones de linfocitos T CD8+ exhaustos. Análisis realizado mediante el programa DIVA.



**Figura 6:** Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. Subpoblaciones de NKs. Análisis realizado mediante el programa DIVA.



**Figura 7:** Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. Subpoblaciones de células T CD4+ reguladoras naturales y células T CD8+ reguladoras naturales. Análisis realizado mediante el programa DIVA.

### 4.3 Análisis de parámetros séricos.

En el momento del análisis, se descongelaron a Tª ambiente todos los sueros de los pacientes incluidos en el estudio y se determinaron los siguientes parámetros:

#### 4.3.1. Parámetros bioquímicos:

La determinación en suero de creatinina, proteínas totales y albúmina se realizó mediante test colorimétricos en los sistemas Roche/ Hitachi cobas c (Roche, Basilea, Suiza). En el mismo sistema Roche/Hitachi cobas c pero mediante inmunoturbidimetría y fotometría, se determinaron los parámetros  $\beta$ -2-microglobulina y calcio, respectivamente.

#### 4.3.2. Inmunoglobulinas totales e isotipo de las inmunoglobulinas.

La determinación de los niveles de los distintos isotipos de Igs en suero se realizó mediante nefelometría con el sistema automático IMAGE 800 de Inmunoquímica (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### 4.3.3. Proteinograma y cuantificación del componente monoclonal

El estudio del proteinograma se realizó por electroforesis capilar mediante el kit comercial “Hydragel Protein”, con el sistema automatizado HYDRASYS 2 (Sebia, Evry, Francia). Si en algunas de las muestras se detectaba la presencia de un CM, se ampliaba un estudio de IFJ mediante el kit comercial “Hydragel” con el mismo sistema automatizado HYDRASYS 2 (Sebia, Evry, Francia).

#### 4.3.4. Cadenas ligeras libres

Las hlcCLL (o FLC, del inglés “Free light chains”) se cuantificaron mediante turbidimetría en el analizador SpaPlus con el kit *Freelite*® (The BindingSite, Birmingham, UK.) siguiendo las indicaciones del fabricante. El cLL se calculó como cadena ligera libre  $\kappa$ /cadena ligera libre  $\lambda$  ( $\kappa/\lambda$ ) y se consideraron como valores normales de referencia aquellos comprendidos entre 0.25-1.66.

### **4.4 Estudios funcionales.**

Se utilizó SP obtenida de forma estéril con EDTA tanto de donantes sanos como de pacientes de MM a los distintos tiempos post TASPE. Las células mononucleares fueron separadas sobre gradiente de Ficoll-Hypaque (Sisma, USA). La sangre se diluyó en proporción 1:1 con solución salina y luego se superpuso sobre la capa de Ficoll y fue centrifugada a 1800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recolectaron las células mononucleares y se lavaron con solución salina. Posteriormente se procedió a su incubación con CFSE (2  $\mu$ l de CFSE 5mM por cada ml de PBS, concentración final de 10  $\mu$ M)) durante 15 minutos.

#### 4.4.1 Activación y proliferación

Las células mononucleares 200 $\mu$ L (2.5 x10<sup>6</sup> células/ml) fueron cultivadas en medio RPMI (GIBCO, USA) con 10% suero fetal bovino (FBS) en duplicado a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>: estimuladas con PHA 5  $\mu$ g/mL y adicionando a las 24horas IL-2 y estimuladas con Ac anti-CD28 y anti-CD3. Como controles se utilizaron células mononucleares no estimuladas, también por duplicado(165).

#### 4.4.2 Análisis de la proliferación por citometría de flujo

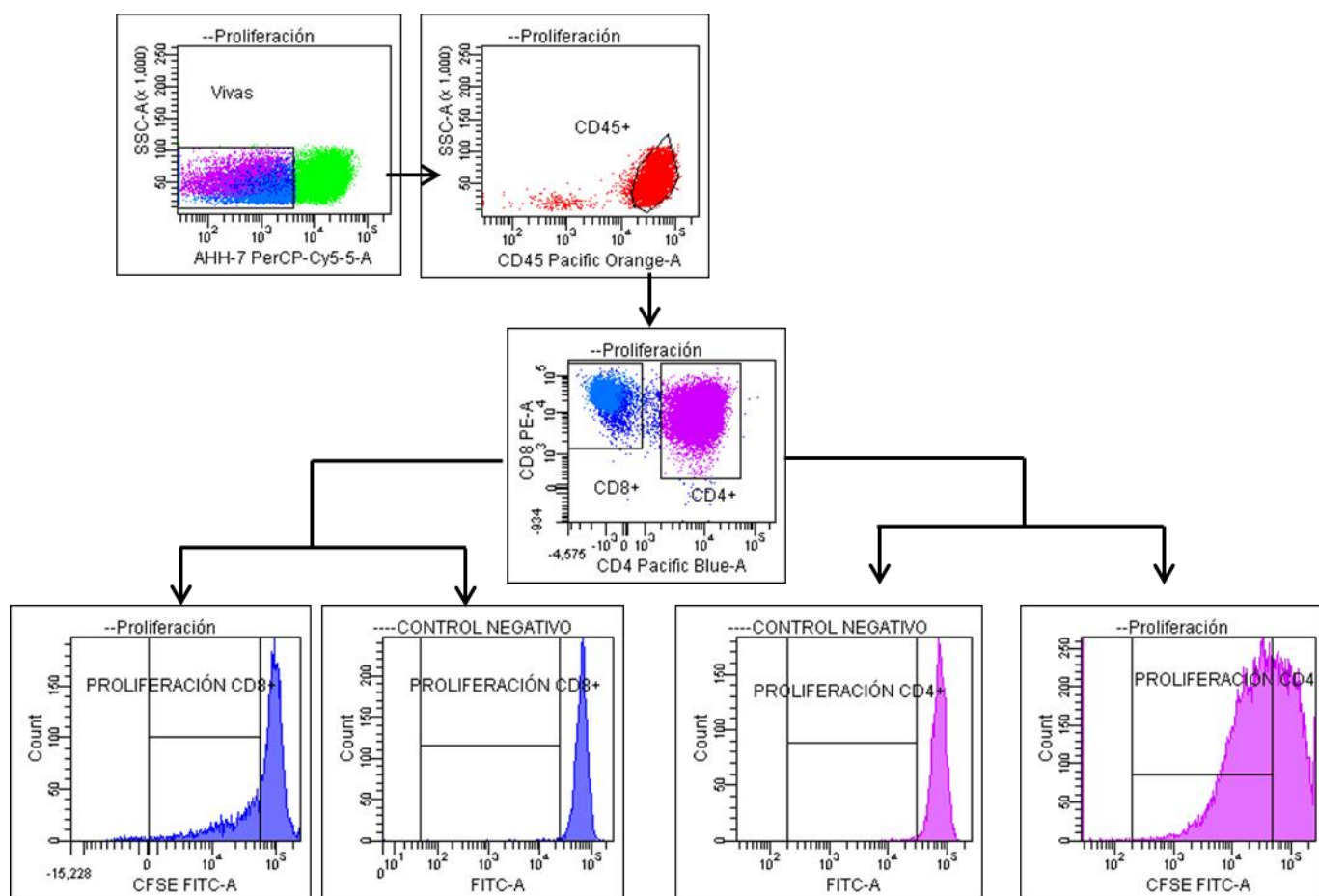
El análisis de las distintas subpoblaciones linfocitarias en SP se realizó utilizando el programa de software DIVA (Becton Dickinson, USA). Se generó una plantilla sobre la que se creó el gráfico de puntos que nos permitió seleccionar las distintas subpoblaciones linfocitarias mediante *gates*.

Las células mononucleares aisladas y marcadas con CFSE fueron incubadas durante 96h y se incubaron con el panel de Ac de la tabla 6 para su estudio por citometría:

Fluorocromos	FITC	PE	PerCP	PECy7	APC	APC-H7	PB	PO
<b>Células cultivadas (Clon)</b>	-	-	7-AAD (A1310)	-	-	CD8 (SK-1)	CD4 (RPA-T4)	CD45 (HI30)

**Tabla 2: Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de proliferación.** Estudio de la proliferación por citometría de flujo multiparamétrica en sangre periférica. Entre paréntesis se indica el clon de anticuerpo utilizado.

En la figura 8 se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de análisis de proliferación de LT-CD4+ y LT-CD8+, utilizando el programa DIVA, en un paciente trasplantado de MM elegido aleatoriamente.



**Figura 8:** Estrategia de análisis para el estudio de proliferación de LT-CD4+ y LT-CD8+. Poblaciones de LT-CD4+ activados y su control negativo y LT-CD8+ activados y su control negativo. Análisis realizado mediante el programa DIVA.

## 5. Análisis estadístico

En el estudio comparativo de los grupos MM-LTCR, MM seguimiento post TASPE, MM con diagnóstico reciente, aféresis y control, se representaron las variables cuantitativas como medidas de tendencia central (media) y desviación estándar (SD).

Las evaluaciones de las diferencias entre los grupos estudiados se llevaron a cabo mediante el test de Mann-Whitney con la corrección *a posteriori* de FDR cuando se comparaban dos grupos y con el test de Kruskal-Wallis y el test *a posteriori* de Dunns cuando se comparaban más de dos grupos. Se consideraron deferencias estadísticamente significativas si  $p \leq 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ;

\*\*\* $p < 0.001$ ). Los resultados estadísticos fueron analizados mediante el programa estadístico PRISM 5.0 de GraphPad (La Jolla, CA, USA).

El análisis estadístico de las recaídas se llevó a cabo con la colaboración de la Unidad de Apoyo Metodológico del Hospital Universitario de la Princesa. Se utilizó el modelo de regresión de Cox para comprobar la asociación de las variables, inicialmente de forma individual y a continuación incluyendo en un modelo multivariante aquellas en la que se obtuvo un p valor  $\leq 0.1$  y se consideraron relevantes.

## RESULTADOS



## **1. Evaluación del inmunofenotipo de las subpoblaciones linfocitarias de pacientes con mieloma múltiple al diagnóstico.**

Previo al estudio de la reconstitución inmunitaria postTASPE se evaluó el inmunofenotipo de las subpoblaciones linfocitarias de SP de pacientes con MM al diagnóstico y se comparó con el de sujetos sanos, con el fin de caracterizar mejor a estos pacientes y su enfermedad.

### **1.1 Características de los pacientes**

El estudio del IF en SP se realizó en 20 pacientes con MM recién diagnosticados (8 hombres y 12 mujeres), que fueron reclutados tras el análisis confirmatorio de MO de la enfermedad, previo a recibir tratamiento. La mediana de edad de los pacientes fue de 66.5 años (53-85 años). Los subtipos de MM fueron: 9 MM tipo IgGκ, 3 IgGλ, 6 IgAκ y 2 IgAλ (tabla 3). Las características de los pacientes al diagnóstico se detallan en la tabla 3.

Nº	Edad	Sexo	Tipo MM	Citogenética	Estadio (DS/ISS)	β-2M (mg/dL)	LDH (U/L)	Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Hb (g/dL)	Proteínas totales (g/dL)
1	57	M	IgAκ	Normal	1A/1	2,43	141	9,5	1,14	12,8	6,9
2	53	F	IgAλ	Trisomía Crm.1	1A/1	1,7	194	8,9	0,65	13,4	7,4
3	65	F	IgGκ	Normal	III A/3	6,9	321	12,5	1,51	7,5	9,2
4	55	F	IgGκ	Normal	LCP	2.2	210	10,5	0,59	7,5	8.3
5	68	M	IgGλ	del13q14	1A/1	2,8	129	9,3	1,04	13	8,5
6	56	M	IgGκ	Normal	ND/2	4,2	312	8,4	1,15	9,1	5,5
7	64	M	IgAκ	Normal	IIIA/2	21,7	122	7,6	0,82	10,6	8,7
8	70	M	IgGκ	Normal	GMSI	6,8	108	10,3	1,65	13	6.0
9	74	F	IgAλ	Ganancia una copia 1q21	IIIA/3	7	171	8,9	0,92	10,4	9,9
10	85	F	IgGκ	ND	III A/2	3,7	169	8.5	0.74	9,3	9,1
11	73	F	IgGκ	del 13q14	MM indolente	2,4	167	9	0,81	11,5	9
12	78	M	IgGλ	del 13q14	IIIA/2	4,1	158	9,2	0,78	13,5	9,9
13	65	F	IgAκ	del p53 del13q14 del1p	IIIA/1	3,8	143	10,5	0,7	14,8	7,8
14	64	F	IgGκ	Normal	IIA/2	4,2	ND	8,9	0,66	10,2	12,5
15	80	F	IgGλ	ND	ND/2	3,1	164	10,8	1,21	12,8	9,3
16	83	F	IgAκ	Normal	IIIA/2	3,8	149	9,8	0,52	8,9	8,9
17	75	M	IgAκ	del 13q14	IIIB/3	40,4	173	12,6	10,07	10,8	9,4
18	87	F	IgAκ	Normal	ND	6,6	163	8,8	4,05	10,9	6,6
19	59	F	IgGκ	Normal	IIA/1	2,9	159	9,3	0,84	14	8,9
20	65	M	IgGκ	Normal	IIIB/3	32,6	150	9.1	3,32	8.6	5,9

**Tabla 3: Características de los pacientes de MM en el momento del diagnóstico.** MM: mieloma múltiple; M: masculino; F: femenino; Crm: cromosoma; ND: no disponible; β/2M: beta-2-microglobulina; DS/ISS: Durie-Salmon/Sistema de Estadaje Internacional; Del: delección; Ca<sup>2+</sup>: calcio; Hb: hemoglobina; LDH: lactato deshidrogenasa; LCP: leucemia de células plasmáticas.

## 1.2 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de los pacientes con MM al diagnóstico.

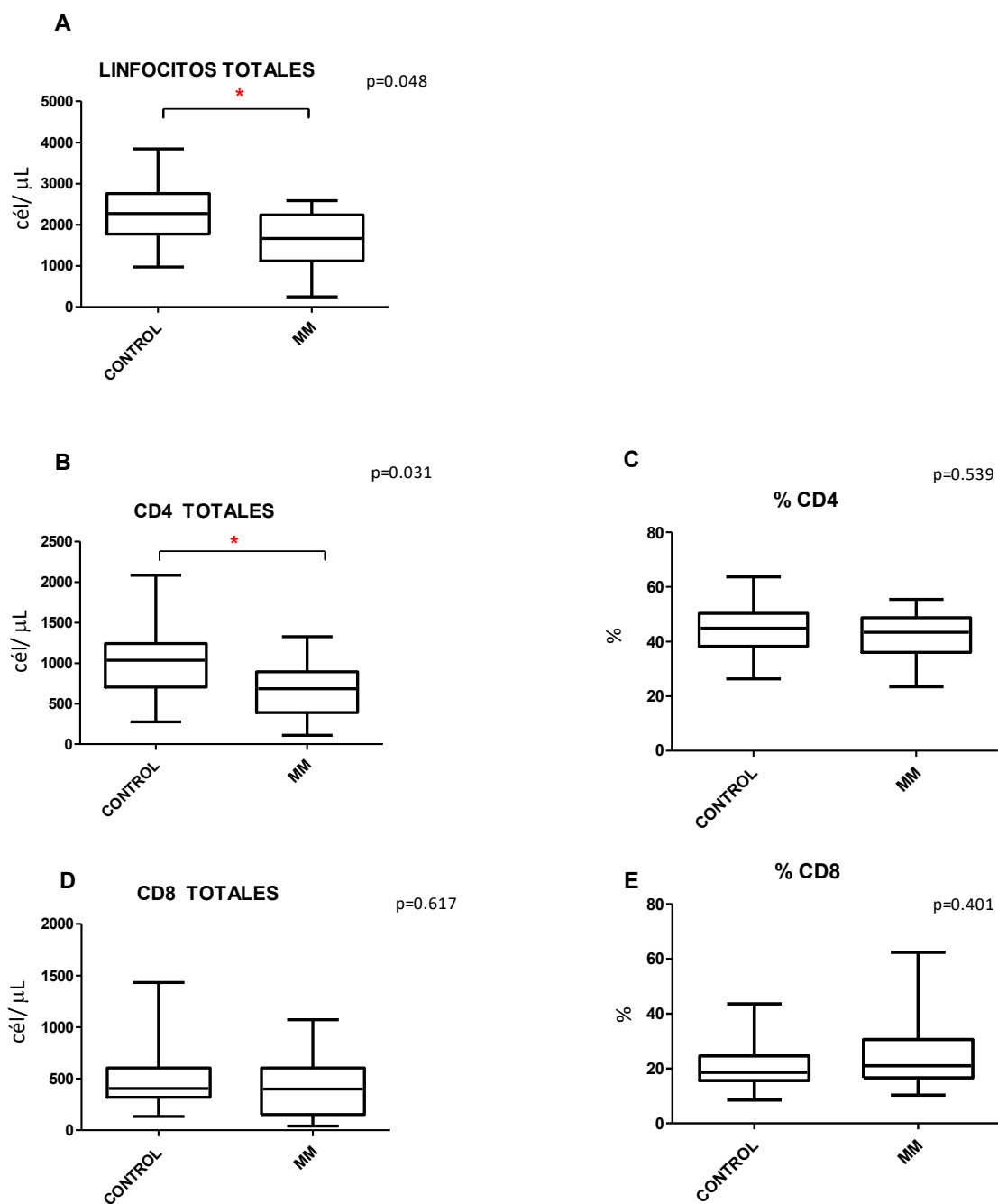
Para ello, se compararon, mediante CMF, la proporción y los valores absolutos de las distintas subpoblaciones de linfocitos en la SP de los pacientes recién diagnosticados de MM frente a los controles sanos.

### 1.2.1 Caracterización de linfocitos T

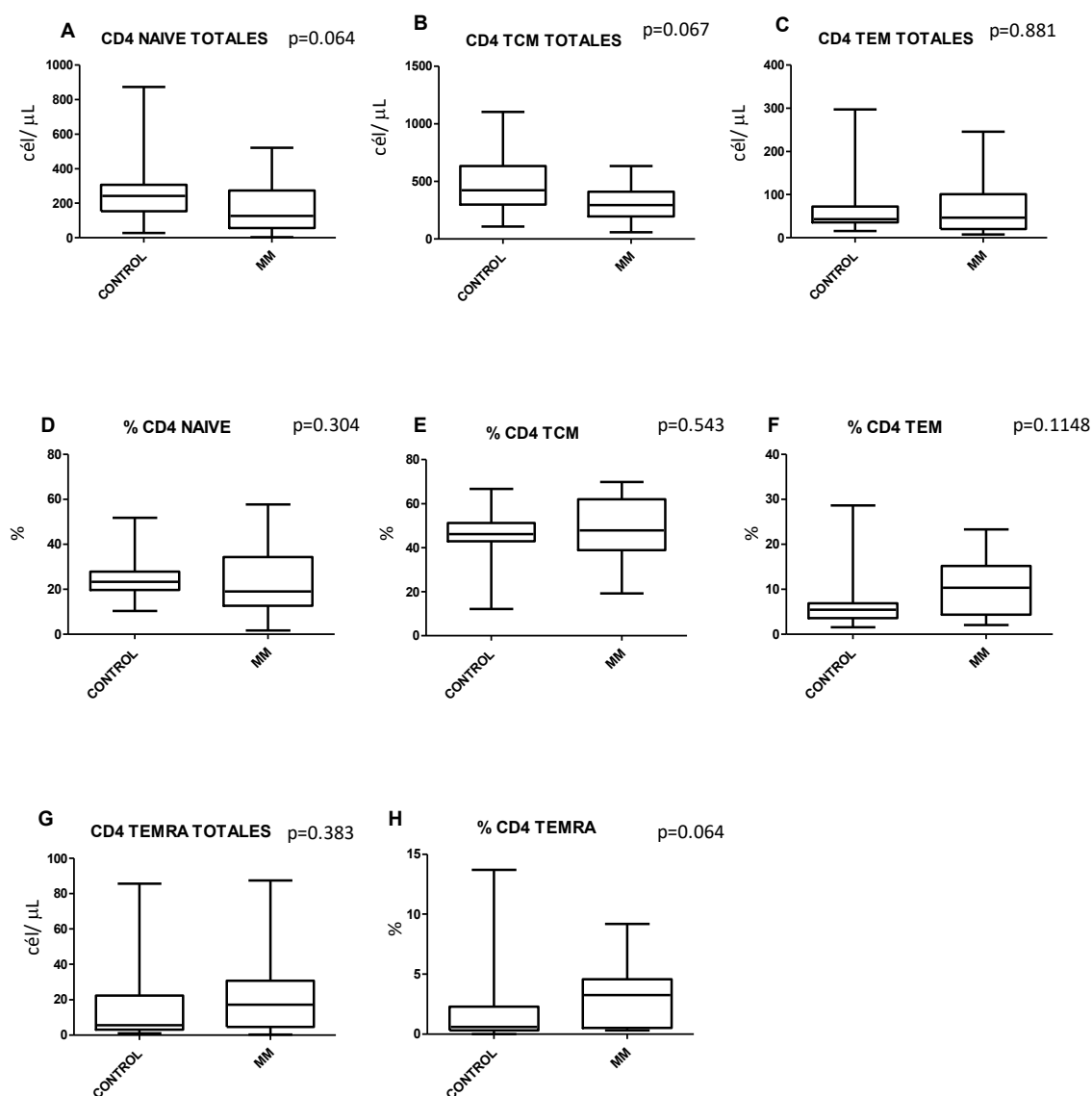
*Los pacientes con diagnóstico reciente de MM presentan menores valores absolutos de linfocitos en sangre periférica, en concreto, de linfocitos T CD4+ y de linfocitos T CD8+ naïve.*

Como se observa en la figura 9, los pacientes de MM al diagnóstico presentaron un menor número de linfocitos totales (figura 9A) y LT-CD4+ totales (figura 9B), sin diferencias en las proporciones de LT-CD4+ o LT-CD8+. Se observó una tendencia al descenso de los LT-CD4+ naïve y TCM totales que no llegó a ser estadísticamente significativa (figura 10A y 10B, respectivamente). También se obtuvieron diferencias en el valor absoluto y porcentaje de LT-CD8+ naïve (figura 11A y 11D, respectivamente), que estaban disminuidos con respecto a los sujetos sanos.

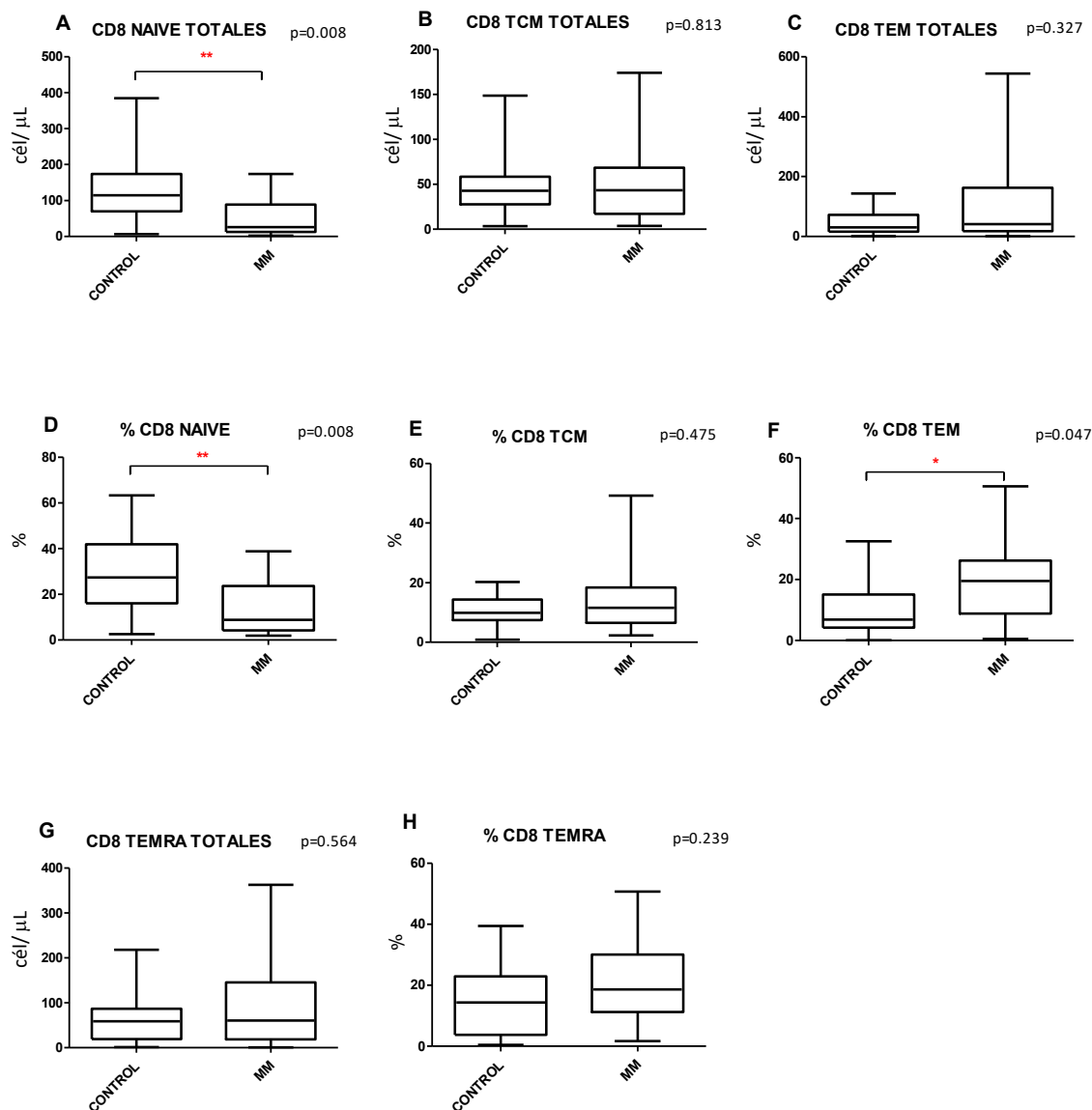
Por otro lado, se observa un aumento del porcentaje de LT-CD4+ TEM y TEMRA y LT-CD8+ TEM y TEMRA. Este aumento solo es significativo en el caso de los LT-CD8+ TEM (figura 11F).



**Figura 9.** Distribución de células T CD4+ y CD8+ en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). **(A, B, D)** Valores absolutos de linfocitos totales, células T CD4+ (CD3+CD4+) y CD8+ (CD3+CD8+). **(C, E)** Proporción de células T CD4+ y CD8+, respectivamente, del total de linfocitos. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis señaladas dos líneas más arriba analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si  $p < 0.05$  y \*\* si  $p < 0.01$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.



**Figura 10.** Distribución de células T CD4+ en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). (**A, B, C, G**) Valores absolutos de células T CD4+ *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+), TCM (CD27+CCR7+CD45RA-), TEM (CD27-CCR7-CD45RA-) y TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+). (**D, E, F, H**) Proporción de células T CD4+ *naïve*, TCM, TEM, TEMRA, del total de células CD4+. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si  $p<0.05$  y \*\* si  $p<0.01$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

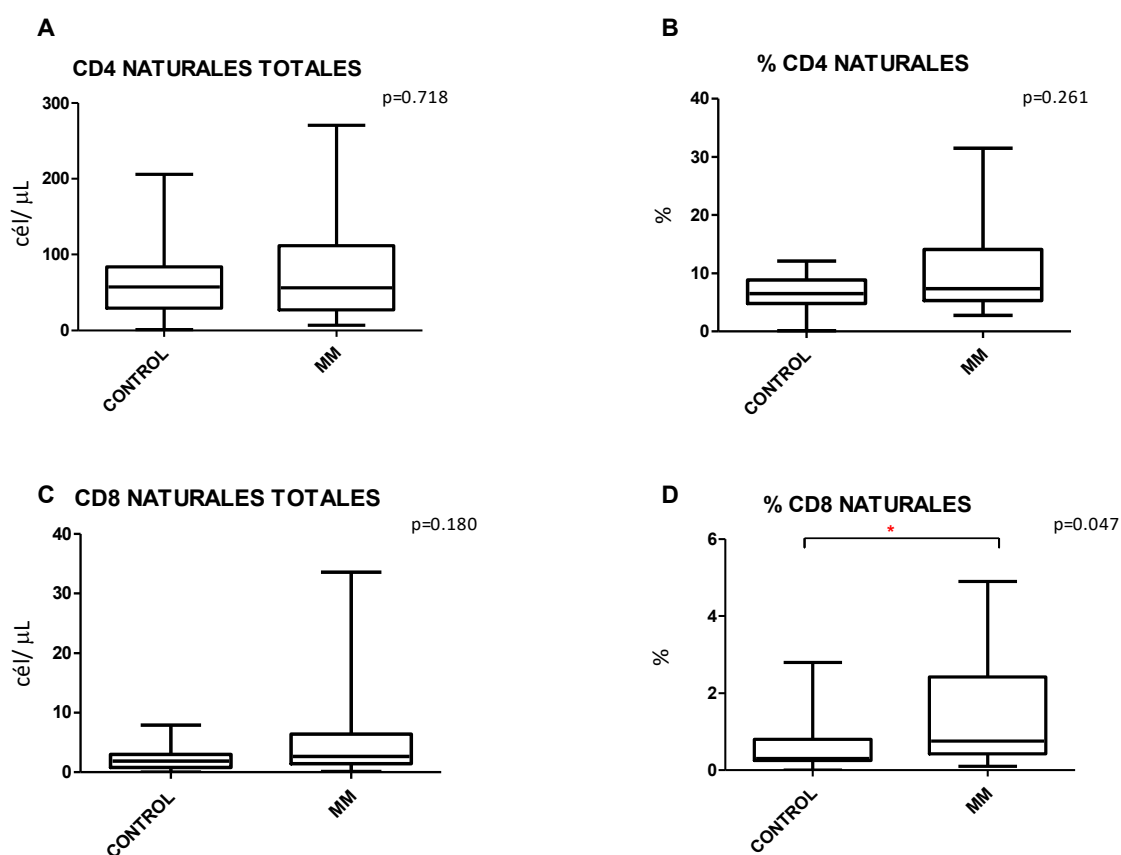


**Figura 11.** Distribución de células T CD8+ en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). (A, B, C, G) Valores absolutos de células T CD8+ *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+), TCM (CD27+CCR7+CD45RA-), TEM (CD27-CCR7-CD45RA-) y TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+). (D, E, F, H) Proporción de células T CD8+ *naïve*, TCM, TEM, TEMRA, del total de células CD8+. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si p<0.05 y \*\* si p<0.01. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 1.2.2 Caracterización de linfocitos Treg

*Los pacientes con diagnóstico reciente de MM presentan un aumento del porcentaje de linfocitos T CD8+ naturales en sangre periférica.*

Como se observa en la figura 12, los pacientes con diagnóstico reciente de MM presentaron un porcentaje superior de LT-CD8+ naturales (figura 12D).



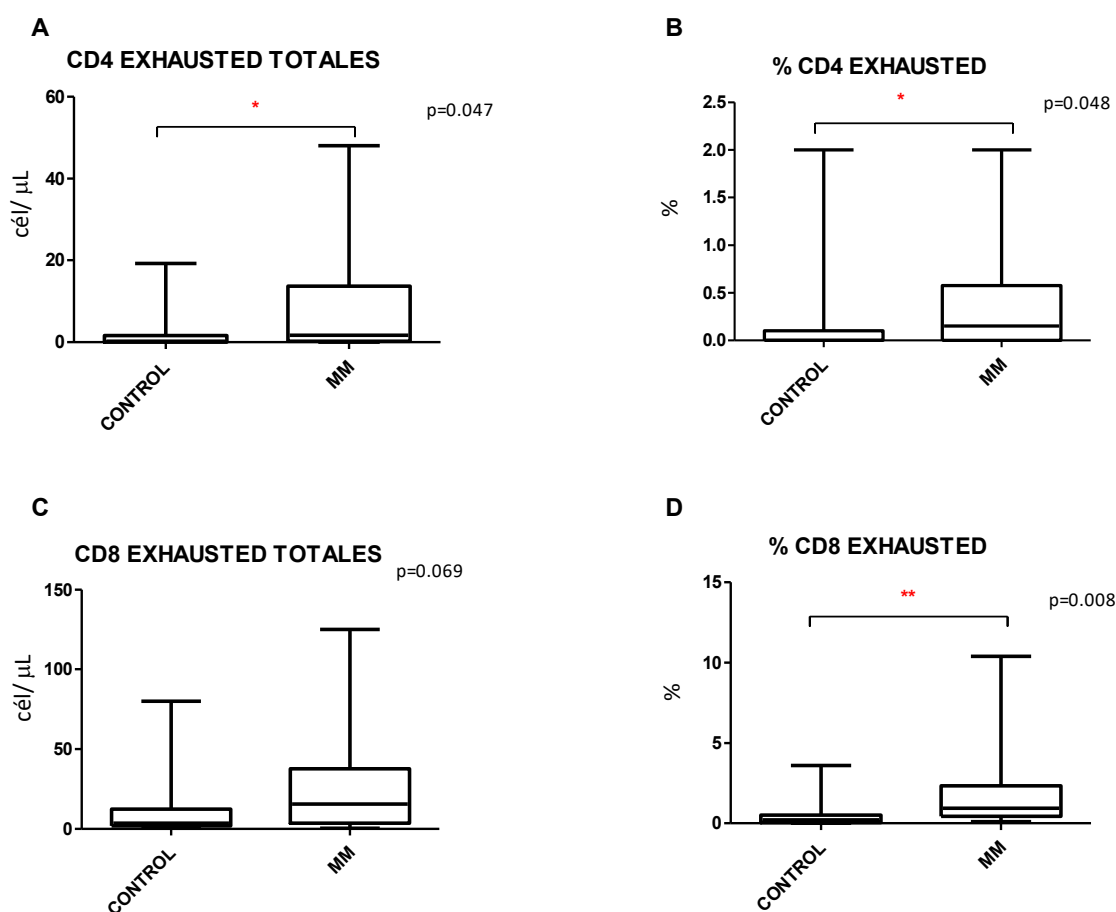
**Figura 12.** Distribución de células Treg en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). **(A, C,)** Valores absolutos de células T CD4+ naturales (CD4+CD25+CD127-) y CD8+ naturales (CD8+CD25+CD127-). **(B, D)** Proporción de células T CD4+ naturales y CD8+ naturales, del total de células CD4+ y CD8+, respectivamente. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si  $p < 0.05$  y \*\* si  $p < 0.01$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.



### 1.2.3 Caracterización de linfocitos T exhaustos

*Los pacientes con diagnóstico reciente de MM presentan un aumento de los linfocitos T exhaustos.*

Como se observa en la figura 13, los pacientes de MM al diagnóstico presentaron un porcentaje y valor absoluto mayores de LT-CD4+ exhaustos (figura 13A y 13B, respectivamente). Este hallazgo se confirma también en el caso de los LT-CD8+ aunque el aumento del valor absoluto de LT-CD8+ exhaustos no llega a ser significativo (figura 13C, 13D).



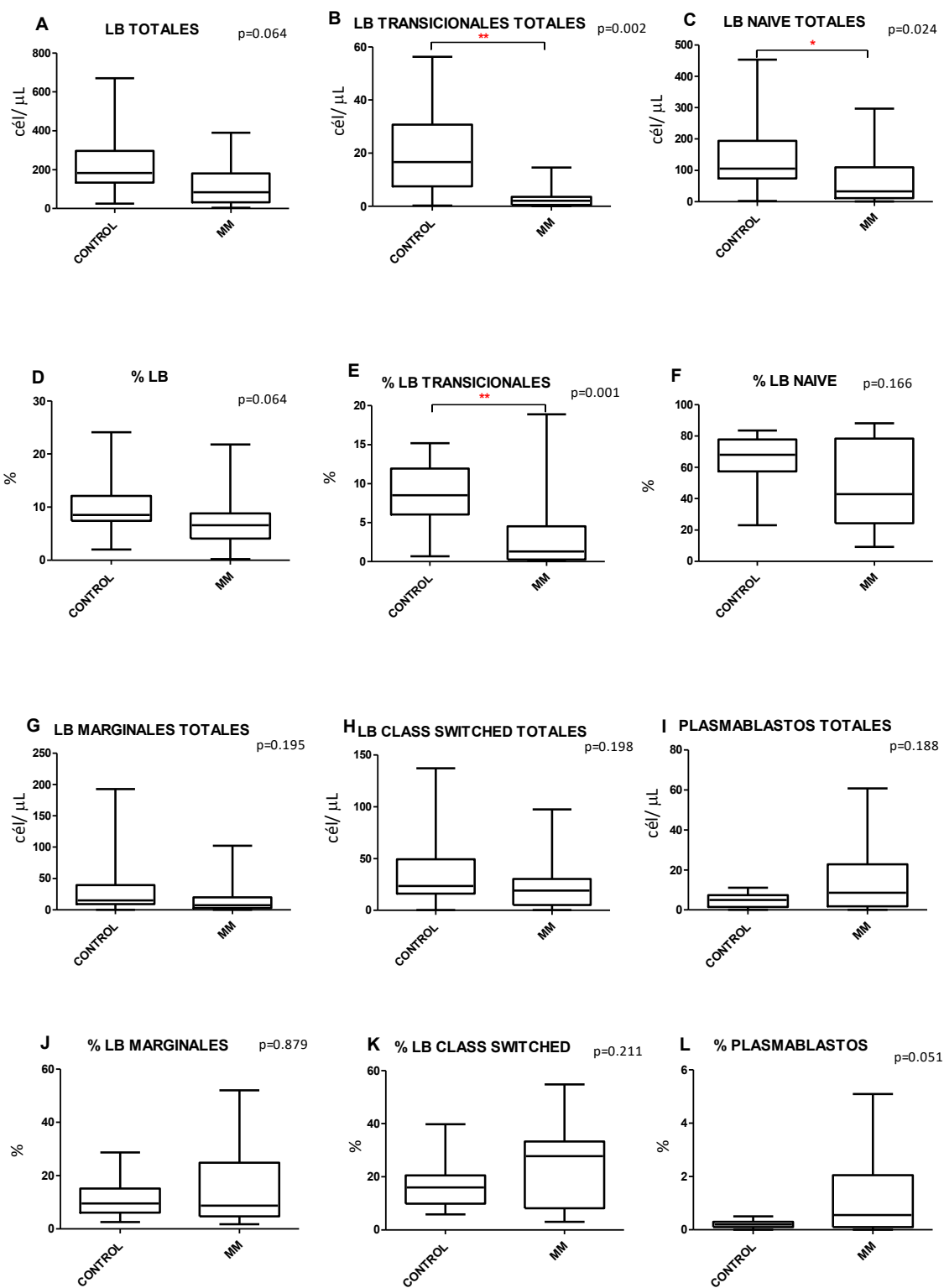
**Figura 13.** Distribución de células T exhaustas en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). **(A, C)** Valores absolutos de células T CD4+ exhaustas (CD4+CD28-CD57+CD279+) y CD8+ exhaustas (CD8+CD28-CD57+CD279+). **(B, D)** Proporción de células T CD4+ exhaustas y T CD8+ exhaustas del total de células T CD4+ y CD8+ respectivamente. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si  $p < 0.05$  y \*\* si  $p < 0.01$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

#### 1.2.4 Caracterización de linfocitos B

*Los pacientes con diagnóstico reciente de MM presentan una menor proporción de linfocitos B naïve y transicionales en sangre periférica.*

Los pacientes con MM tienen menos LB al diagnóstico, aunque la diferencia no llega a ser significativa (figura 14 A, D). Además, encontramos diferencias significativas en las subpoblaciones. Así, se observó una reducción de los LB transicionales tanto en porcentaje como en valor absoluto (figura 14B y 14E, respectivamente). Así mismo, los valores absolutos de LB naïve también estaban disminuidos comparados con los sujetos sanos (figura 14C).

No encontramos otros hallazgos significativos a excepción de una tendencia al aumento de plasmablastos en los pacientes.



**Figura 14.** Distribución de células B en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). (A, B, C, G, H, I) Valores absolutos de células B totales, transicionales (CD27-CD10+CD38+), *naïve* (CD27-IgD+IgM+), memoria marginales (CD27+IgD+IgM+), memoria con cambio de clase (CD27+IgD-IgM-) y plasmablastos (CD20-CD27++CD38++). (D, E, F, J, K, L) Proporción de células B totales, transicionales, *naïve*, memoria marginales, memoria con cambio de clase y plasmablastos del total de células B. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si  $p < 0.05$  y \*\* si  $p < 0.01$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

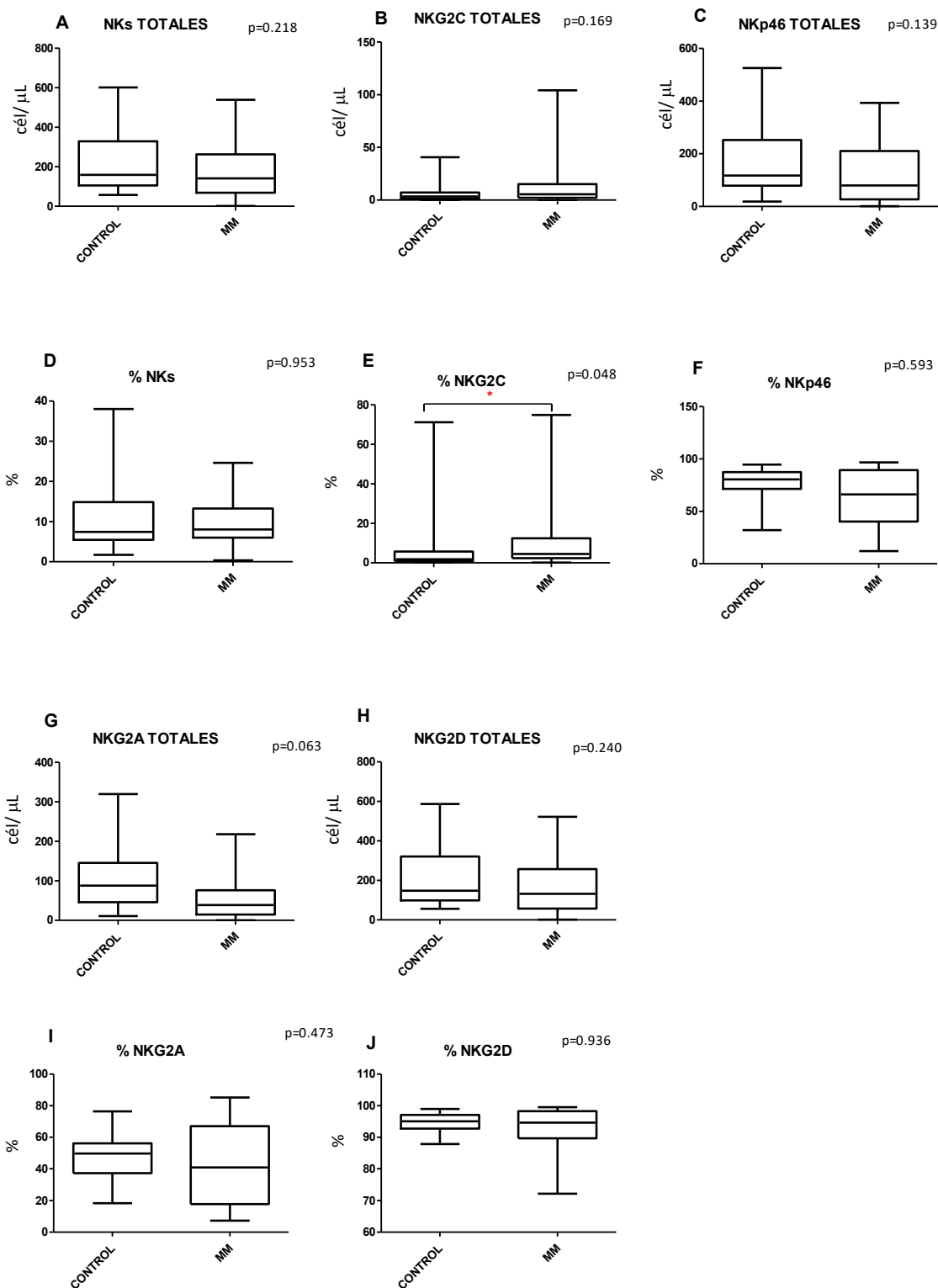
### 1.2.5 Caracterización de células NK

*Los pacientes con diagnóstico reciente de MM tienen una distribución característica del porcentaje del receptor de membrana de las células NK NKG2C.*

Los pacientes con diagnóstico reciente de MM tenían el mismo porcentaje y valor absoluto de células NK que los controles sanos (figura 15A y 15D, respectivamente). En cuanto a los receptores activadores e inhibidores, no se observaron diferencias en la distribución de los receptores activadores NKp46 (figura 15C y 15F) ni NKG2D (figura 15H y 15J). Sin embargo, se observó un aumento en porcentaje en la expresión de la molécula activadora NKG2C en los pacientes de nuevo diagnóstico con respecto a los controles (figura 15E).

Por otro lado, se observa una tendencia a la disminución del marcador de inhibición NKG2A, sin llegar a ser esta disminución estadísticamente significativa (figura 15G y 15I, respectivamente).

Al mismo tiempo, se analizó también el porcentaje de las distintas moléculas no sólo sobre la población de células NKs como previamente describimos, sino también sobre linfocitos totales, donde resultó significativamente disminuida la proporción de la población NK NKG2D+ (no se muestra figura).



**Figura 15.** Distribución de células NK en sangre periférica de pacientes con MM al diagnóstico (n=20) y donantes sanos (n=25). **(A, B, C, G, H)** Valores absolutos de células NK totales (CD3-CD56+), NKG2C, NKp46, NKG2A y NKG2D. **(D, E, F, I, J)** Proporción de células NK totales, NKG2C, NKp46, NKG2A y NKG2D del total de células NK. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Mann-Whitney tras la corrección FDR, indicándose \* si  $p < 0.05$  y \*\* si  $p < 0.01$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

## 2. Evaluación de la reconstitución inmunitaria en pacientes con mieloma múltiple tras trasplante autólogo.

Se realizó el seguimiento de la reconstitución inmunitaria postTASPE desde el mes 3 al mes 24 y se comparó con pacientes LTCR y sujetos sanos. En este seguimiento se analizó el inmunofenotipo de las distintas subpoblaciones linfocitarias y se cuantificaron las inmunoglobulinas en suero.

### 2.1 Características de los pacientes

#### 2.1.1 Pacientes trasplantados

El estudio del IF en SP se realizó en 31 pacientes con MM tratados con TASPE (13 hombres y 18 mujeres). Los pacientes fueron estudiados desde el mes 3 al mes 24 postTASPE, realizando el IF cada 3 meses. La mediana de edad de los pacientes fue 59 años y los subtipos de MM en este grupo fueron 10 MM tipo IgGκ, 4 IgGλ, 4 IgAκ, 3 IgAλ, 4 BJκ, 2 BJλ y 4 no disponible.

La respuesta preTASPE se evaluó siguiendo las indicaciones del grupo IMWG. Como tratamiento de inducción se utilizaron los esquemas de quimioterapia: VTD (bortezomib-talidomida-dexametasona), VRD (bortezomib-lenalidomida-dexametasona), DRD (daratumumab-lenalidomida-dexametasona), VD (bortezomib-dexametasona), PAD (bortezomib-doxorrubicina-dexametasona), RD (lenalidomida-dexametasona), VCD (bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona), R (lenalidomida), MD (melfalán-dexametasona). Como terapia de acondicionamiento se utilizaron altas dosis de melfalán (Mel) en 28 pacientes y fludabarina más melfalán (FluMel) en 1 paciente. Las demás características de los pacientes y detalles de la terapia se resumen en la tabla 4.

Nº	Edad	Sexo	Tipo MM	Respuesta preTASPE	Ciogenética	Estadio (DS/ISS)	Tratamiento inducción	Acondicionamiento	SLP (meses)
1	62	M	IgA κ	MBRP	Trisomía 5 (90%); Trisomía 15 (65%); Trisomía y tetrasomía 9	II A/1	VRD	Mel 200	27
2	54	F	IgG κ	RC	Normal	II-A/2	VD	Mel 140	PS
3	69	F	IgG κ	RP	Normal	II-A/1	RD	Mel 140	RC
4	59	F	BJ λ	RC	Normal	III-A/3	VRD	Mel 200	RC
5	41	F	BJ λ	RP	Normal	III-B/3	VD/PAD	Mel 100	3
6	53	F	IgA λ λPOEMS	ND	ND		MD	Mel 200	RC
7	62	F	IgG λ	RP	del p53	III-A/2	RD	FluMel	18
8	64	M	IgG κ	MBRP	Normal	III-B/1	VTD+R	Mel 200	PS
9	36	M	IgG λ	RP	Normal	II-A/1	VTD	Mel 200	RC
10	67	M	IgG κ	RP	Normal	III-A/1	VTD	Mel 200	RC
11	58	F	IgG κ	RP	del13q14	III-A/3	VCD/VRD	Mel 200	21
12	53	M	BJ λ	MBRP	Normal	III-B/3	VD	Mel 140	27
13	60	F	IgG κ	RP	Normal	III-B/3	VCD	Mel 140	30
14	71	M	BJ κ	RC	Normal	III A/1	VD/RD	Mel 140	RC
15	62	M	IgA λ	MBRP	ND	II-A/2	VTD	Mel 200	PS
16	41	F	IgGλ	MBRP	Normal	II-A/1	VTD	Mel 200	RC
17	62	M	IgA κ	MBRP	del p53/ del13q14	I-A/1	VD	Mel 200	15
18	41	F	IgGλ	RC	Normal	III-B/3	PAD/VD	Mel 200	RC
19	59	M	IgG κ	RP	del1p32	II-A/1	VD	Mel 200	6
20	57	F	IgA λ	MBRP	del p53/ del13q14	ND/1	VTD	Mel 140	RC
21	67	F	IgGκ	MBRP	Normal	III-A/3	DRD	Mel 200	RC
22	65	F	IgA κ	MBRP	del13q14/ reordenamiento IgH/ ganancia una copia 1q21	II-B/3	VD	Mel 200	3
23	57	F	LCP IgGκ	RP	Normal	I-A/1	DRD	Mel 200	6
24	63	F	IgA κ	RP	del p53/del13q14/del1p	III-A/1	VRD	Mel200	RC
25	64	F	IgG κ	BRP	Normal	II-A/2	VTD+VRD	Mel 200	RC
26	59	M	ND	RC	ND	ND	VTD+VRD	Mel 200	PS
27	ND	V	ND	ND	ND	ND	ND	ND	PS
28	67	F	ND	RC	ND	ND	VD/VCD	Mel140	PS
29	52	M	BJ λ	NC	Normal	II-A/1	VTD	Mel 200	RC
30	55	M	BJ λ	RC	ND	IIA/1	VTD	Mel200	PS
31	66	F	IgA	ND	ND	ND	VTD	Mel 200	PS

**Tabla 4: Características de los pacientes de MM que recibieron TASPE.** MM: mieloma múltiple; SLP: supervivencia libre de progresión; M: masculino; F: femenino; MBRP: muy buena respuesta parcial; RP: respuesta parcial; RC: remisión completa, BJ: Bences Jones, Del: delección.; ND: no disponible; PS: pérdida de seguimiento, DS/ISS: Durie-Salmon/Sistema de Estadígrafo Internacional; Mel: Melfalán; Flu: Fludabarina; VTD: Bortezomib-talidomida-dexametasona; VRD: Bortezomib-lenalidomida-dexametasona; DRD: Daratumumab-lenalidomida-dexametasona; VD: Bortezomib-dexametasona; PAD: bortezomib-doxorrubicina-dexametasona; RD: Lenalidomida-dexametasona; VCD: Bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona ; R: Lenalidomida; MD: melfalán-dexametasona.

### 2.1.2 Pacientes MM-LTCR

El estudio del IF en SP se realizó en 16 pacientes con MM trasplantados (8 hombres y 8 mujeres) que se encontraban en remisión de larga duración (> 6 años) postTASPE (MM-LTCR). Los pacientes fueron reclutados aleatoriamente tras el trasplante. La mediana de edad de los pacientes fue 70 años. Los subtipos de MM en este grupo fueron 5 MM tipo IgGκ, 3 IgGλ, 5 IgAλ, 1 BJκ, 2 BJλ.

La respuesta preTASPE se evaluó siguiendo las indicaciones del grupo IMWG. Como tratamiento de inducción se utilizaron los esquemas de quimioterapia VD (bortezomib-dexametasona), VBCMP (vincristina-carmustina-ciclofosfamida-melfalán-prednisona), VAD (vincristina-doxorubicina-dexametasona), VBAD (vincristina-carmustina-doxorubicina-dexametasona), TD (talidomida-dexametasona), VD (bortezomib-dexametasona), TVD (talidomida-vincristina-dexametasona) o BVP (carmustina-vincristina-prednisona). Como terapia de acondicionamiento se utilizaron altas dosis de melfalán (Mel) en 12 pacientes y busulfán más melfalán (BuMel) en 3 pacientes. Las demás características de los pacientes y detalles de la terapia de resumen en la tabla 5.



Nº paciente	Edad	Sexo	Tipo MM	Años posTASPE	Respuesta preTASPE	Estadio (DS/ISS)	Inducción	Acondicionamiento
1	61	F	IgA $\lambda$	7	RC	IIA/I	BVP	Mel 200
2	59	F	IgG $\kappa$	13	RC	IIA/ND	TVD	Mel 200
3	71	M	IgA $\lambda$	12	RP	IIA/ND	VBCMP/VBAD	Mel 200
4	70	F	IgA $\lambda$	7	RP	IIIA/1	VD	Mel 200
5	75	M	Ig G $\kappa$	14	MBRP	IIA/ND	VBCMP-VBAD	Mel 200
6	67	F	BJ $\lambda$	15	RO	II-A/1	VD	BuMel
7	57	M	IgG $\kappa$	12	MBRP	IIA/2	TD	Mel 200
8	66	F	BJ $\lambda$	20	ND	ND	VBCMP/VBAD	BuMel
9	53	F	IgG $\lambda$	16	ND	IIA/1	VD	Mel 200
10	49	M	BJ $\kappa$	12	MBRP	ND	VAD	Mel 200
11	76	M	IgG $\kappa$	22	RC	IIIA/3	VAD	BuMel
12	61	F	IgG $\lambda$	12	RC	IIB/ND	VAD	Mel 140
13	80	F	IgG $\kappa$	17	RC	IIIA/ND	VBCMP/VBAD	Mel 200
14	53	M	IgG $\lambda$	15	RC	IIA/ND	VBCMP/VBAD	Mel 200
15	65	M	IgA $\lambda$	14	RC	ND	VAD	Mel 200
16	71	M	IgA $\lambda$	12	RP	IIA/ND	VBCMP/VBAD	Mel 200

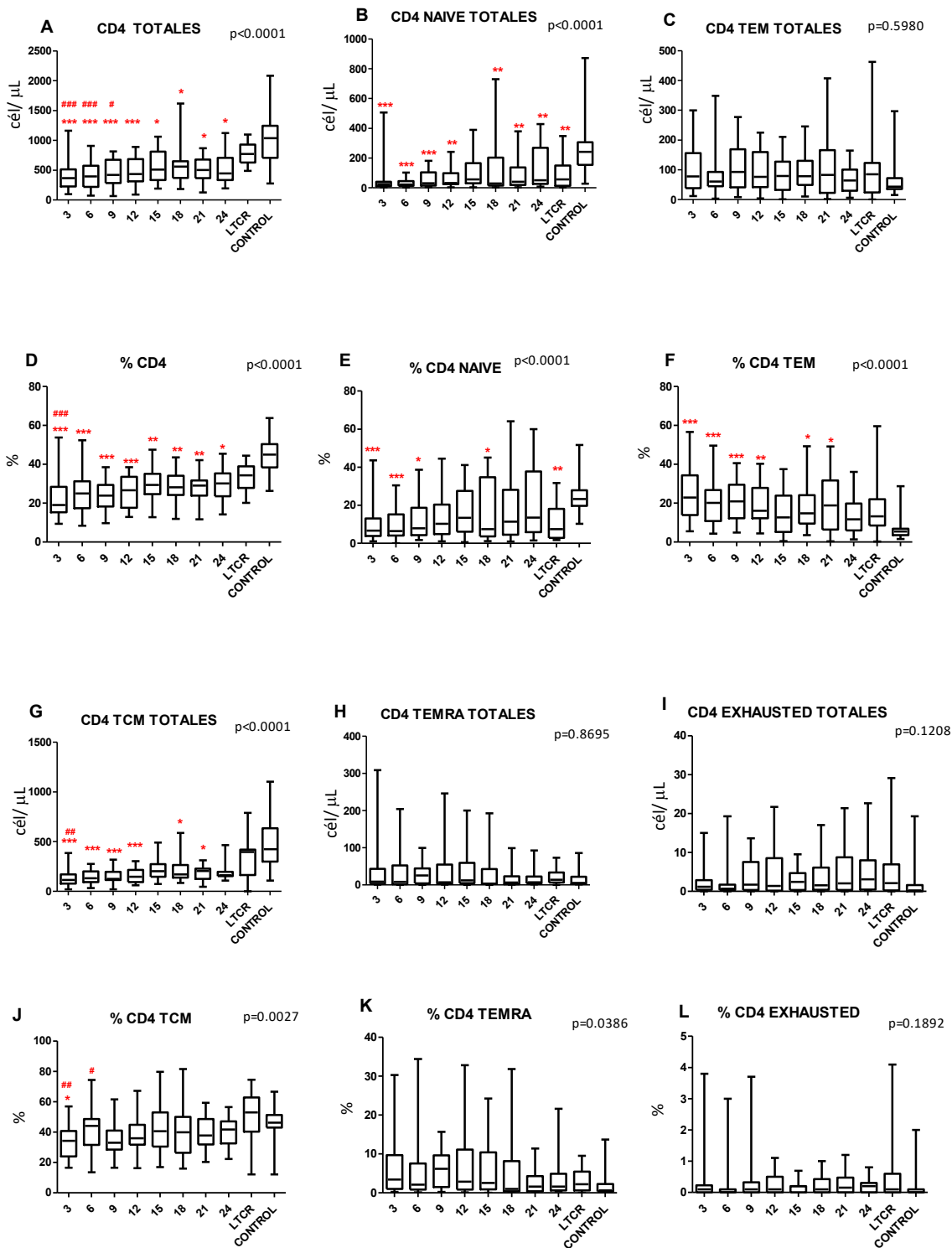
**Tabla 5: Características de los pacientes MM-LTCR.** MM: mieloma múltiple; M: masculino; F: femenino; MBRP: muy buena respuesta parcial; RP: respuesta parcial; RC: remisión completa, BJ: Bences Jones, ND: no disponible;  $\beta$ /2M: beta-2-microglobulina, DS/ISS: Durie-Salmon/Sistema de Estadaje Internacional; Del: delección; VD: Bortezomib-dexametasona; Mel: Melfalán; Bul: Busulfán; VBCMP: vincristina-carmustina-ciclofosfamida-melfalán-prednisona; VAD: vincristina-doxorubicina-dexametasona; VBAD: Vincristina-carmustina-doxorubicina-dexametasona; TD: Talidomida-dexametasona; VD: Bortezomib-dexametasona; TVD: talidomida-vincristina-dexametasona; BVP: carmustina-vincristina-prednisona.

## 2.2 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias tras trasplante autólogo en pacientes con MM.

### 2.2.1 Caracterización de linfocitos T

*Los pacientes de MM trasplantados no llegan a recuperar los niveles de linfocitos T CD4+ que presentan los sujetos sanos y se caracterizan por una disminución de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ naïve y CD4+ TCM.*

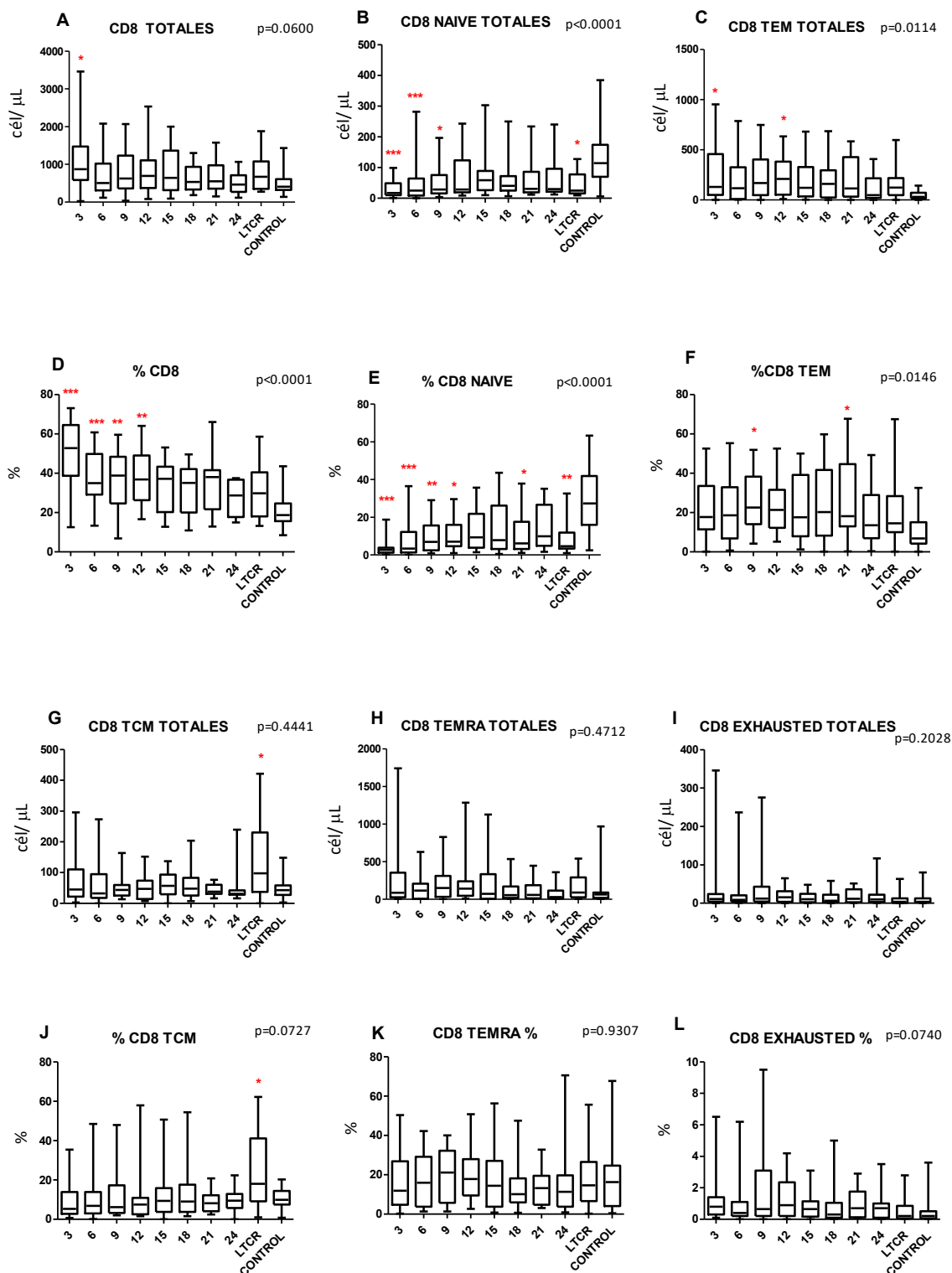
Como se observa en la figura 16, los pacientes presentaron valores absolutos y porcentajes menores de LT-CD4+ que los sujetos sanos hasta pasados 24 meses del trasplante (figura 16A y 16D, respectivamente), a diferencia de los LTRC, cuyos LT-CD4+ alcanzaron los rangos de normalidad(86). Los valores absolutos de LT-CD4+ naïve y de LT-CD4+ TCM tampoco se recuperan a los 24 meses del trasplante (figura 16B y 16G, respectivamente), al igual que lo que sucedía con los pacientes LTRC. Por su parte, el porcentaje de LT-CD4+ TEM fue superior que el de los sujetos sanos (figura 16F), aunque no se tradujo en un aumento de los valores absolutos de dicha población (figura 16C).



**Figura 16.** Distribución de células T CD4+ en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE (n=31), pacientes LTCR (n=16) y donantes sanos (n=25). (A, B, C, G, H, I) Valores absolutos de células T CD4+ (CD3+CD4+), *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+), TEM (CD27-CCR7-CD45RA-), TCM (CD27+CCR7+CD45RA-), TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+) y exhaustas (CD4+CD28-CD57+CD279+). (D, E, F, J, K, L) Proporción de células T CD4+, *naïve*, TEM, TCM, TEMRA, y exhaustas del total de células CD4+. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y \*\*\* si  $p < 0.001$  respecto del grupo control y # si  $p < 0.05$ , ## si  $p < 0.01$  y ### si  $p < 0.001$  respecto del grupo LTCR. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

*Los pacientes de MM trasplantados se caracterizan por un aumento en la proporción de LT-CD8+ y una disminución de la proporción de la subpoblación de LT-CD8+ naïve hasta el mes 12 post TASPE.*

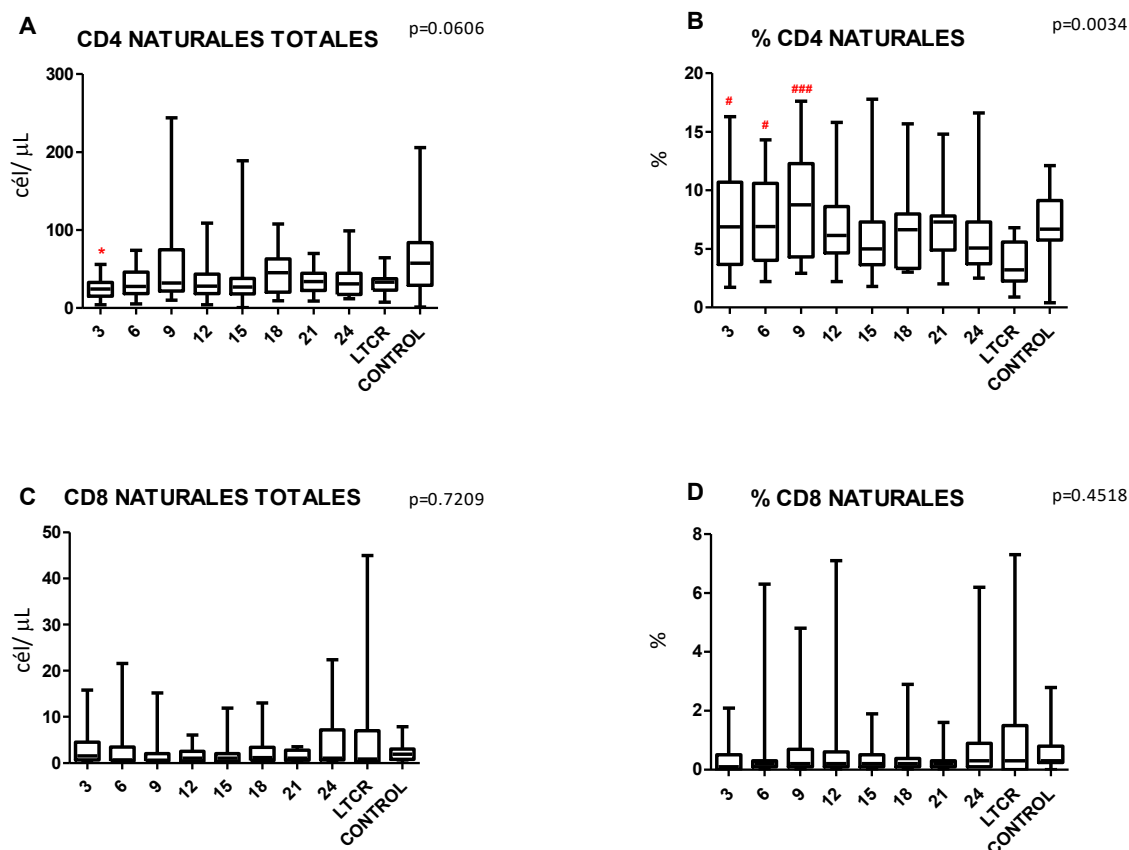
Como se observa en la figura 17, los sujetos trasplantados presentaron valores absolutos superiores de LT-CD8+ en el mes 3 post TASPE y porcentaje mayor de LT-CD8+ hasta el mes 12 (figura 17A y 17D, respectivamente). Los valores absolutos y relativos de LT-CD8+ *naïve* se encontraban disminuidos hasta el mes 9 y 12, respectivamente (figura 17B y 17E, respectivamente).



**Figura 17.** Distribución de células T CD8+ en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE (n=31), pacientes LT-CR (n=16) y donantes sanos (n=25). (A, B, C, G, H, I) Valores absolutos de células T CD8+ (CD3+CD8+), *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+), TEM (CD27-CCR7-CD45RA-), TCM (CD27+CCR7+CD45RA-), TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+) y exhaustas (CD8+CD28-CD57+CD279+). (D, E, F, J, K, L) Proporción de células T CD8+, *naïve*, TEM, TCM, TEMRA, y exhaustas del total de células CD8+. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si p<0.05, \*\* si p<0.01 y \*\*\* si p< 0.001 respecto del grupo control y # si p<0.05, ## si p<0.01 y ### si p< 0.001 respecto del grupo LT-CR. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

*La reconstitución inmunitaria de los pacientes de MM se caracteriza por un aumento en la proporción de LT-CD4+ naturales.*

A pesar de observar una disminución en los valores absolutos de LT-CD4+ naturales, estas diferencias no llegan a ser significativas salvo en el mes 3 tras TASPE (figura 18A). Por el contrario, la proporción de LT-CD4+ naturales se encuentra aumentada en estos pacientes si la comparamos con la de los pacientes LT-CR (figura 18B).



**Figura 18.** Distribución de células Treg en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE (n=31), pacientes LT-CR (n=16) y donantes sanos (n=25). **(A, C)** Valores absolutos de células Treg CD4+ naturales (CD4+CD25+CD127-) y CD8+ naturales (CD4+CD25+CD127-). **(B, D)** Proporción de células Treg CD4+ naturales, y CD8+ naturales, del total de células CD4+ y CD8+ respectivamente. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p<0.05$ , \*\* si  $p<0.01$  y \*\*\* si  $p<0.001$  respecto del grupo control y # si  $p<0.05$ , ## si  $p<0.01$  y ### si  $p<0.001$  respecto del grupo LT-CR. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

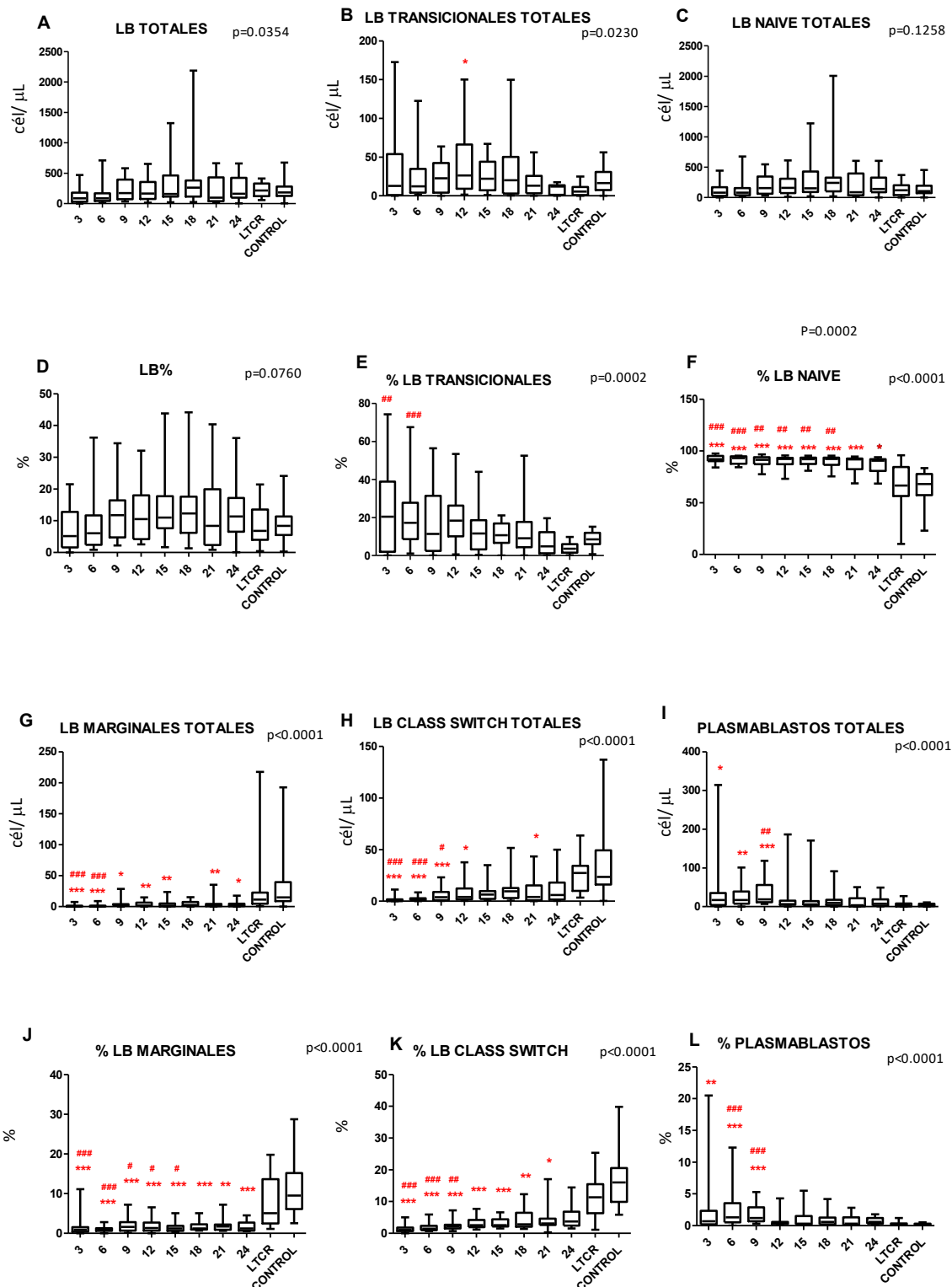
### 2.2.2 Caracterización de linfocitos B

*La reconstitución inmunitaria de los pacientes de MM tras TASPE se caracteriza por una disminución de los valores absolutos y la proporción de los LB de memoria marginales y con cambio de clase, así como por un aumento de la proporción y valores absolutos de los plasmablastos y la proporción de los LB naïve.*

A pesar de no encontrar variaciones en los LB totales sí encontramos variaciones en sus subpoblaciones. Así, los pacientes trasplantados de MM presentaron un aumento de la proporción de LB naïve hasta los 24 meses postTASPE (figura 19F). La proporción de LB transicionales también se vio incrementada, resultando significativo este aumento hasta el mes 9 (figura 19E).

Los LB de memoria marginales se mantuvieron disminuidos tanto en proporción como en valor absoluto hasta el mes 24 (figura 19G y 19J) y lo mismo podemos decir para los LB de memoria con cambio de clase en valores absolutos y en proporción (figura 19J y 19K). Finalmente, los plasmablastos también aumentaron hasta el mes 9 postTASPE, tanto en valores absolutos como en proporción (figura 19I y 19L).





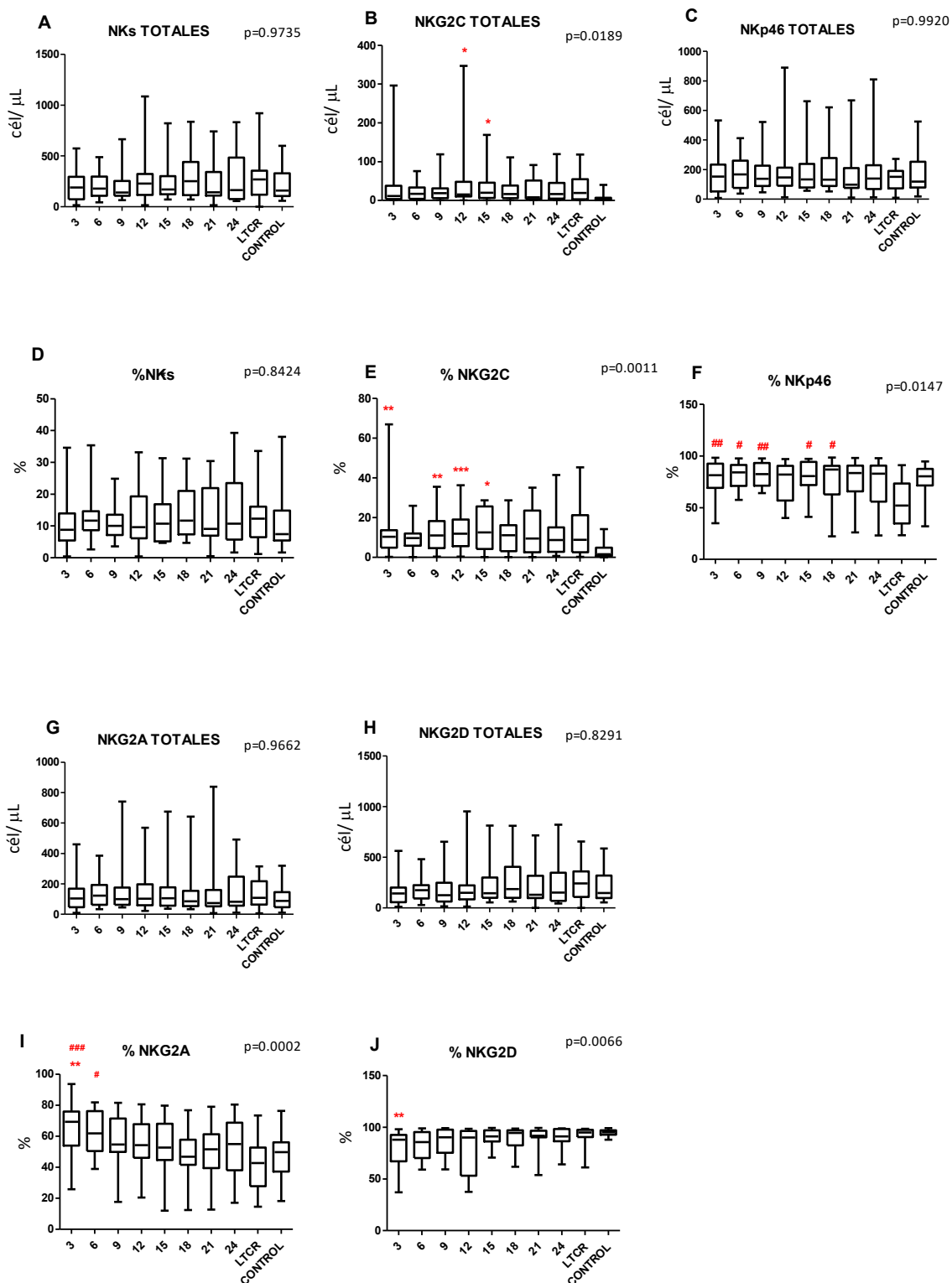
**Figura 19.** Distribución de células B en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE (n=31), pacientes LT-CR (n=16) y donantes sanos (n=25). **(A, B, C, G, H, I)** Valores absolutos de células B totales, transicionales (CD27-CD10+CD38+), *naïve* (CD27-IgD+IgM+), marginales (CD27+IgD+IgM+), de cambio de clase (CD27+IgD-IgM-) y plasmablastos (CD20-CD27++CD38++). **(D, E, F, J, K, L)** Proporción de células B totales, transicionales, *naïve*, marginales, de cambio de clase y plasmablastos del total de células B. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis de con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si p<0.05, \*\* si p<0.01 y \*\*\* si p< 0.001 respecto del grupo control y # si p<0.05, ## si p<0.01 y ### si p< 0.001 respecto del grupo LTCR. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 2.2.3 Caracterización de células NK

*La reconstitución inmunitaria en pacientes de MM postTASPE se caracteriza por un aumento de la proporción de la subpoblación NKG2A y NKG2C y una disminución de NKG2D.*

Al igual que sucedía con los LB, no encontramos diferencias en los valores totales y proporción de células NKs totales, pero sí que observamos una redistribución de sus subpoblaciones. Encontramos un aumento en la proporción de NKG2C que se mantiene hasta el mes 15 postTASPE (figura 20E), y un aumento de la proporción de la subpoblación NKG2A que se va estabilizando hasta alcanzar los valores de los sujetos sanos (figura 20I).

Por otro lado, en el mes 3 hay una disminución de la proporción del marcador NKG2D, que posteriormente se recupera hasta alcanzar los valores normales (figura 20J).



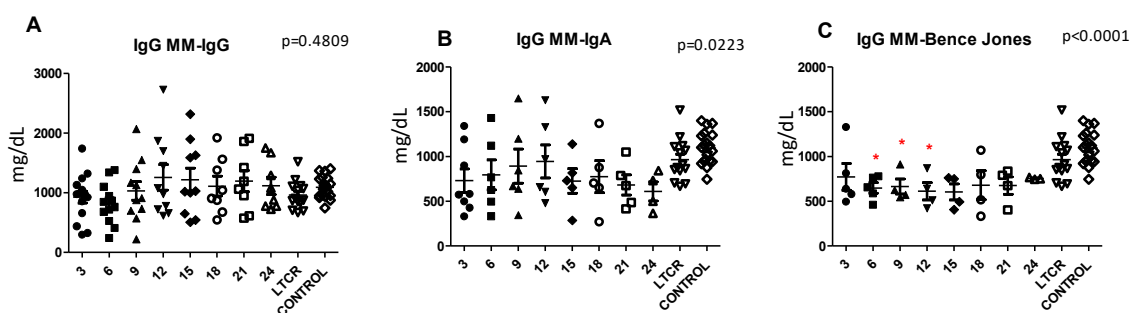
**Figura 20.** Distribución de células NK en sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE (n=31), pacientes LT-CR (n=16) y donantes sanos (n=25). **(A, B, C, G, H)** Valores absolutos de células NK totales (CD3-CD56+), NKG2C, Nkp46, NKG2A y NKG2D. **(D, E, F, I, J)** Proporción de células NK totales y de NKG2C, Nkp46, NKG2A y NKG2D del total de células NK. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y \*\*\* si  $p < 0.001$  respecto del grupo control y # si  $p < 0.05$ , ## si  $p < 0.01$  y ### si  $p < 0.001$  respecto del grupo LTRC. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

## 2.2.4 Reconstitución de la inmunidad humoral

### 2.2.4.1 Reconstitución de IgG

*Los niveles de la Ig tipo IgG se recuperan rápidamente postTASPE en los distintos tipos de MM.*

Como se muestra en la figura 21, los niveles séricos de IgG en pacientes con MM se recuperaron de forma temprana tras el trasplante, si exceptuamos los MM de tipo Bence Jones en los que los niveles de esta Ig permanecen más bajos que en los otros tipos de MM y que en los controles hasta el mes 12.



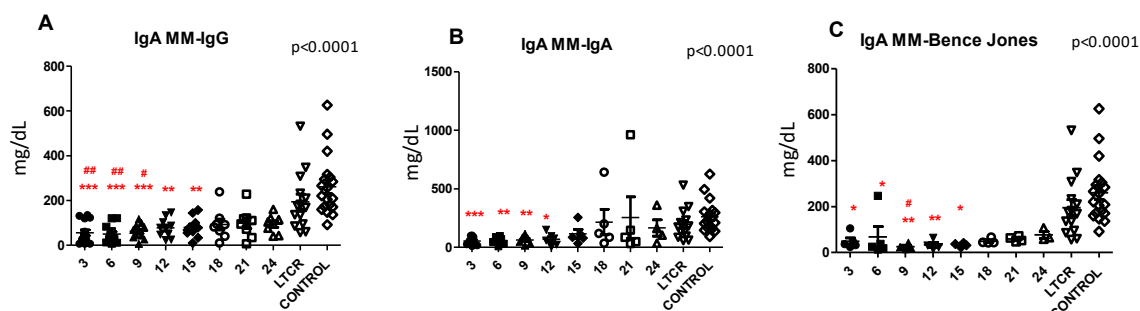
**Figura 21:** Evolución de los niveles séricos de inmunoglobulinas IgG postTASPE en los distintos tipos de MM. **(A, B, C)** Niveles plasmáticos (mg/dL) de IgG postTASPE en MM tipo IgG (N= 15), IgA (N=8), Bence Jones (N=5), pacientes LT-CR (N=14) y controles (N=18). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y \*\*\* si  $p < 0.001$  respecto del grupo control y # si  $p < 0.05$ , ## si  $p < 0.01$  y ### si  $p < 0.001$  respecto del grupo LTRC. Las escalas varían dependiendo del tipo de MM analizado.

### 2.2.4.2 Reconstitución IgA

*La Ig de tipo IgA se caracteriza por una lenta recuperación, sin alcanzar los niveles normales hasta el mes 15 postTASPE.*

Como observamos en la figura 22, la recuperación de los niveles normales de IgA no se alcanza hasta el mes 18 postTASPE en el caso de los MM de tipo IgG y Bence Jones (figura 22A y 22C, respectivamente). Los MM de tipo IgA presentan una reconstitución más temprana de los niveles plasmáticos de IgA que los otros dos tipos de MM descritos previamente, recuperándose los niveles normales en el mes 15 postTASPE (figura 22B).

A pesar de no encontrar diferencias significativas, observamos que los niveles de IgA en los MM de tipo Bence Jones se recuperan más lentamente que en los otros tipos de MM.



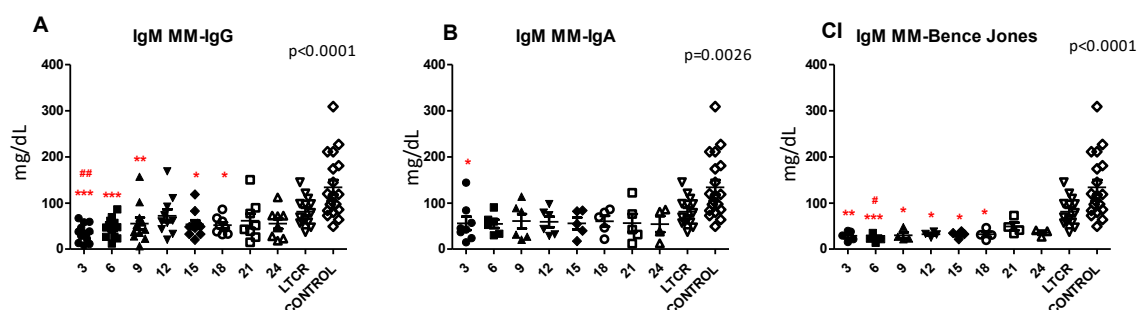
**Figura 22:** Evolución de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas IgA postTASPE en los distintos tipos de MM. (A, B, C) Niveles plasmáticos (mg/dL) de IgA postTASPE en MM tipo IgG (N=15), IgA (N=8), Bence Jones (N=5), pacientes LTCR (N=14) y controles (N=18). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y \*\*\* si  $p < 0.001$  respecto del grupo control y # si  $p < 0.05$ , ## si  $p < 0.01$  y ### si  $p < 0.001$  respecto del grupo LTCR. Las escalas varían dependiendo del tipo de MM analizado.

### 2.2.4.3 Reconstitución IgM

*La recuperación de los niveles normales de IgM varía entre los distintos tipos de MM.*

Como observamos en la figura 23, la recuperación de los niveles de IgM varía entre los distintos tipos de MM, siendo el MM de tipo IgA el que recupera los valores normales más tempranamente (figura 23B), seguido del MM de tipo IgG (figura 23A). El MM de tipo Bence Jones no presenta niveles normales de IgM hasta el mes 18, inclusive, a pesar de que las diferencias no son significativas,

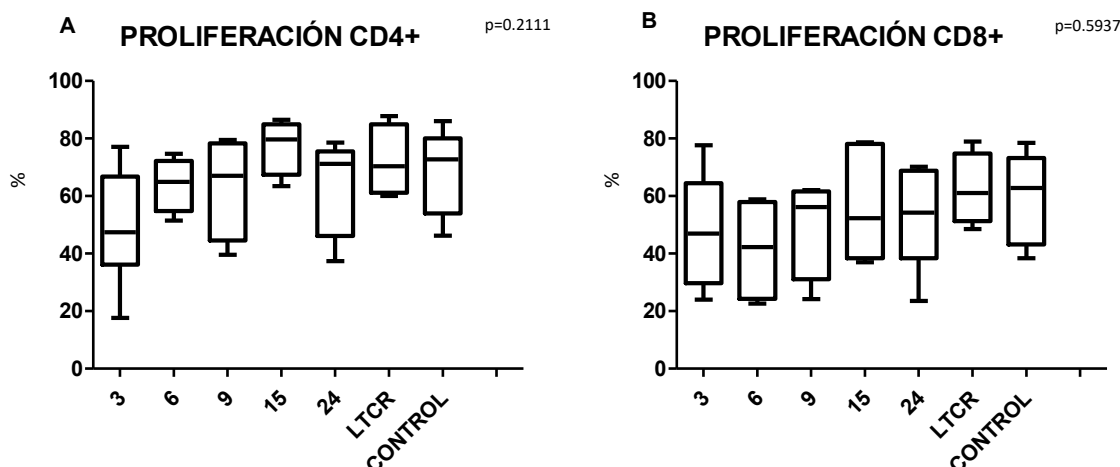
observamos que los niveles de IgM en este tipo de MM siguen siendo bajos a los dos años postTASPE (figura 23C).



**Figura 23:** Evolución de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas IgM postTASPE en los distintos tipos de MM. (A, B, C) Niveles plasmáticos (mg/dL) de IgM postTASPE en MM tipo IgG (N= 15), IgA (N=8), Bence Jones (N=5), pacientes LTCR (N=14) y controles (N=18). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p<0.05$ , \*\* si  $p<0.01$  y \*\*\* si  $p<0.001$  respecto del grupo control y # si  $p<0.05$ , ## si  $p<0.01$  y ### si  $p<0.001$  respecto del grupo LTCR. Las escalas varían dependiendo del tipo de MM analizado.

### 2.2.5 Evaluación de la proliferación postTASPE

Con el fin de considerar la reconstitución inmunitaria más en detalle, quisimos también evaluar la competencia funcional de los LT mediante ensayos de proliferación *in vitro*, en los que los LT se activaron con los estímulos policlonales que proporcionan los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Como se observa en la figura 24, tras el TASPE se observó una menor proliferación tanto de los LT CD4+ como CD8+ respecto a los LTCR y los controles sanos, que sin embargo no fue significativa y que alcanza valores similares a los normales a los 6-9 meses aproximadamente.



**Figura 24. Porcentaje de proliferación tras TASPE a distintos tiempos.** Representación del porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4+ (A) y CD8+ (B) cultivados a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio con RPMI con 10% FBS tras estimulación con anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3(165). Se usó como control negativo células no estimuladas y como control positivo células estimuladas con PHA e IL-2. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor "p" obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns.

### 3. Evaluación del inmunofenotipo de las aféresis de pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple.

Se evaluaron las proporciones de las distintas subpoblaciones linfocitarias en las aféresis con el fin de analizar tanto la calidad de la aféresis como la posible influencia de la misma en la reconstitución postTASPE.

#### 3.1 Características de los pacientes

##### 3.1.1 Pacientes de las aféresis

El estudio del IF en las aféresis se realizó en 28 pacientes con MM (15 hombres y 13 mujeres). La mediana de edad de los pacientes fue 62 años y los subtipos de MM en este grupo fueron 10 MM tipo IgGκ, 5 IgGλ, 7 IgAκ, 3 IgAλ, 2 BJκ, 1 BJλ.

La respuesta preTASPE se evaluó siguiendo las indicaciones del grupo IMWG. Como tratamiento de inducción se utilizaron los esquemas de quimioterapia: VTD (bortezomib-talidomida-dexametasona), VRD: (bortezomib-lenalidomida-dexametasona), DRD (daratumumab-lenalidomida-dexametasona), VD (bortezomib-dexametasona), VCD (bortezomib-ciclofosfamida-

dexametasona), DLD (daratumumab-lenalidomida) y LD (lenalidomida-dexametasona). Las demás características de los pacientes y detalles de la terapia de resumen en la tabla 6.

Nº	EDAD	SEXO	TIPO MM	CD 34+(10 <sup>6</sup> )/kg	VOLUMEN (mL)	ESTADIO	Tratamiento	Ciclos
1	64	M	IgG κ	2,3	560	III B/1	VTD	6
2	65	M	IgG κ	2,3	740	II A/2	VTD	9
3	36	M	IgG λ	3	246	II A/1	VTD	4
4	60	M	IgA κ	2,4	800	III A/3	VTD	6
5	67	M	IgG κ	4,6	300	III A/1	VD	6
6	58	F	IgG κ	4,15	272	III A/3	VCD/VRD	5/3
7	57	F	IgG κ	2,28	520	III B/3	VCD	5
8	69	M	BJ κ	3,2	522	III A/1	VD/LD	3/7
9	62	M	IgA λ	5,7	320	II A/2	VTD	6
10	38	F	IgG λ	2,4	520	II A/2	VTD	5
11	66	F	IgG λ	3,9	320	II A/NC	VTD	3
12	66	F	IgA κ	2,2	490	II A/2	VTD	6
13	55	F	IgA λ	2,4	399	NC/1	VTD	6
14	44	M	IgG κ	5	232	NC/NC	VTD	6
15	55	M	IgG κ	4	NC	II A/NC	VTD	6
16	58	F	BJ κ	2,64	508	II A/1	VTD	9
17	65	F	IgG κ	2,5	630	III A/3	VCD	7
18	65	F	IgA κ	3,4	420	II B/3	VD	5
19	64	M	IgG κ	3,2	408	NC/NC	VTD	6
20	53	M	IgG λ	2,5	540	II A	VTD/VRD	4/5
21	64	M	IgA κ	3,3	220	III A/2	VRD	6
22	43	F	IgA λ	4,3	240	II A/2	VTD	9
23	52	F	IgG κ	4,3	300	II A/1	VCD	6
24	68	M	IgA κ	6,1	600	III A/3	VTD	6
25	64	F	IgA κ	3,9	474	III A/1	VRD	6
26	57	M	BJ λ	3,2	300	II A/NC	VRD	8
27	67	F	IgA κ	2,95	378	II A/2	VCD	6
28	59	M	IgG λ	2,2	1180	II A/1	DLD	8

**Tabla 6: Características de los pacientes de MM a los que se les realizó aféresis.** MM: mieloma múltiple; M: masculino; F: femenino; BJ: Bence Jones; NC: no consta; DS/ISS: Durie-Salmon/Sistema de Estadaje Internacional; VTD: Bortezomib-talidomida-dexametasona; VRD: Bortezomib-lenalidomida-dexametasona; DRD: Daratumumab-lenalidomida-dexametasona; VD: Bortezomib-dexametasona; VCD: Bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona; DLD: Daratumumab-lenalidomida; LD: Lenalidomida-dexametasona.



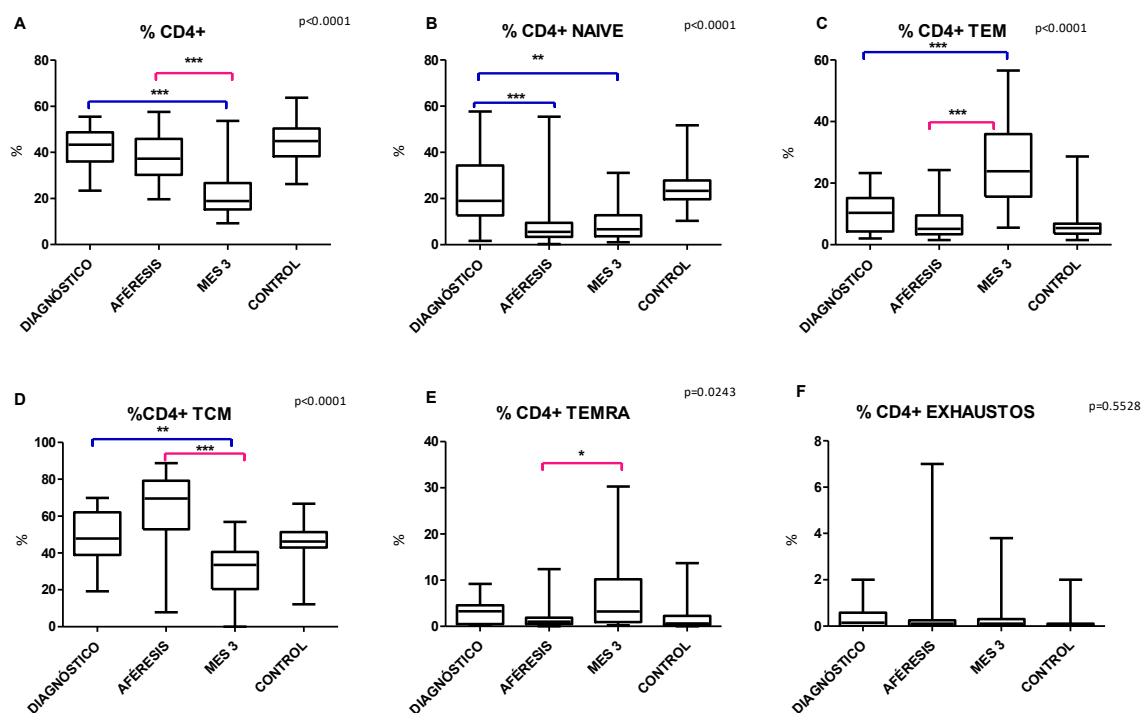
### 3.2 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en las aféresis de los pacientes con MM.

Debido a la alta celularidad presente en las aféresis con respecto a la celularidad presente en sangre periférica, se procedió a la comparación únicamente de las proporciones de las poblaciones y no de sus valores absolutos. Señalar que los pacientes de esta cohorte son distintos de los del estudio de la reconstitución inmunitaria.

#### 3.2.1 Caracterización de linfocitos T

Como se observa en la figura 25B, las aféresis de los pacientes con MM presentaron una disminución significativa de la proporción de LT CD4+ *naïve* (figura 25B) con respecto de los pacientes con diagnóstico reciente de MM, mientras que el resto de las subpoblaciones no diferían.

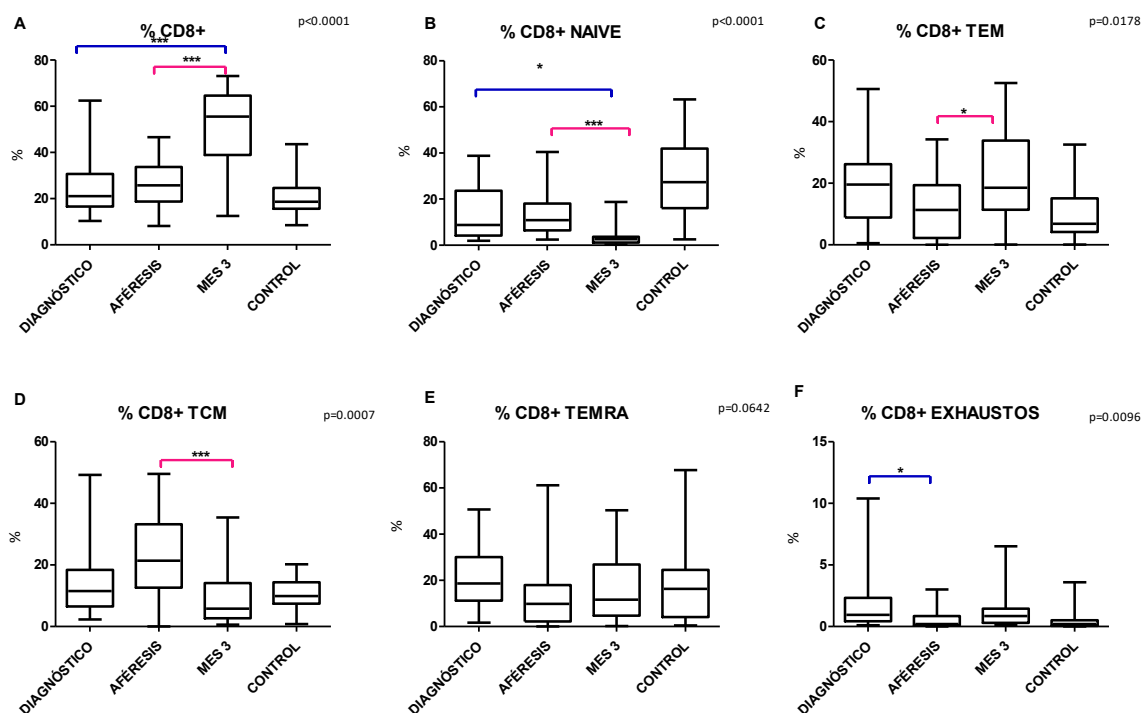
Por otro lado, se observaron bastantes diferencias entre los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias de las aféresis y del mes 3 postTASPE (figura 25A, 25C, 25D y 25E).



**Figura 25.** Distribución de células T CD4+ en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM (n=20), aféresis (n=28) y MM tras TASPE al mes 3 (n=31). (A, B, C, D, E, F) Proporción de células T CD4+ (CD3+CD4+), *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+), TEM (CD27-CCR7-CD45RA-), TCM (CD27+CCR7+CD45RA-), TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+) y exhaustas (CD4+CD28-CD57+CD279+) del total de células CD4+. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si p<0.05, \*\* si p<0.01 y \*\*\* si p<0.001. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

Como se observa en la figura 26F, las aféresis de pacientes con MM presentaban una disminución estadísticamente significativa de la proporción de la subpoblación de linfocitos T CD8+ exhaustos comparado con dicha proporción al diagnóstico.

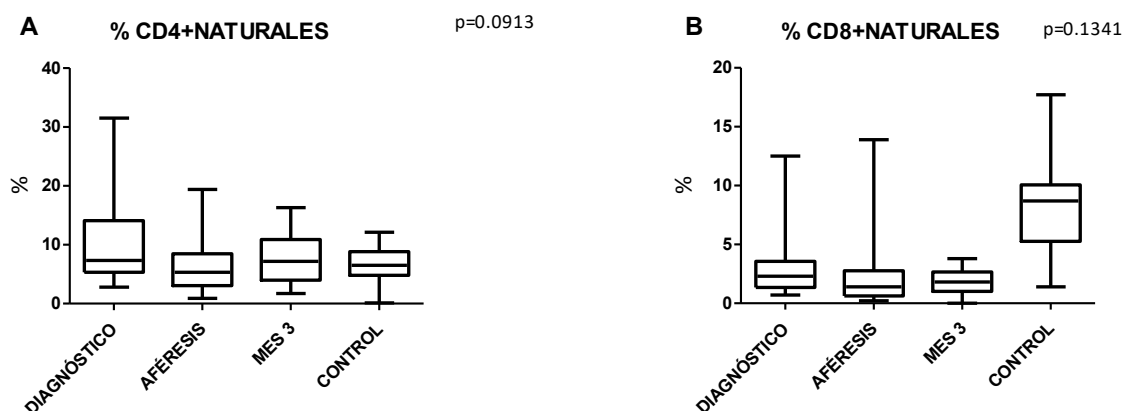
También observamos que la proporción de linfocitos T CD8+ es menor (figura 26A) que en los pacientes recién trasplantados mientras que los linfocitos T CD8+ *naïve* (figura 26B) y TCM (figura 26D) estaban aumentados en las aféresis con respecto al mes 3 postTASPE.



**Figura 26.** Distribución de células T CD8+ en sangre periférica de pacientes con al diagnóstico con MM (n=20), aféresis (n=28) y MM tras TASPE al mes 3 (n=31). (A, B, C, D, E, F) Proporción de células T CD8+ (CD3+CD4+), *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+), TEM (CD27-CCR7-CD45RA-), TCM (CD27+CCR7+CD45RA-), TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+) y exhaustas (CD8+CD28-CD57+CD279+) del total de células CD8+. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95(línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si p<0.05, \*\* si p<0.01 y \*\*\* si p< 0.001. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 3.2.2 Caracterización de linfocitos Treg

Como se observa en la figura 27, las aféresis de los pacientes de MM no presentaron diferencias en los LT reguladores con respecto a los pacientes al diagnóstico ni postTASPE.

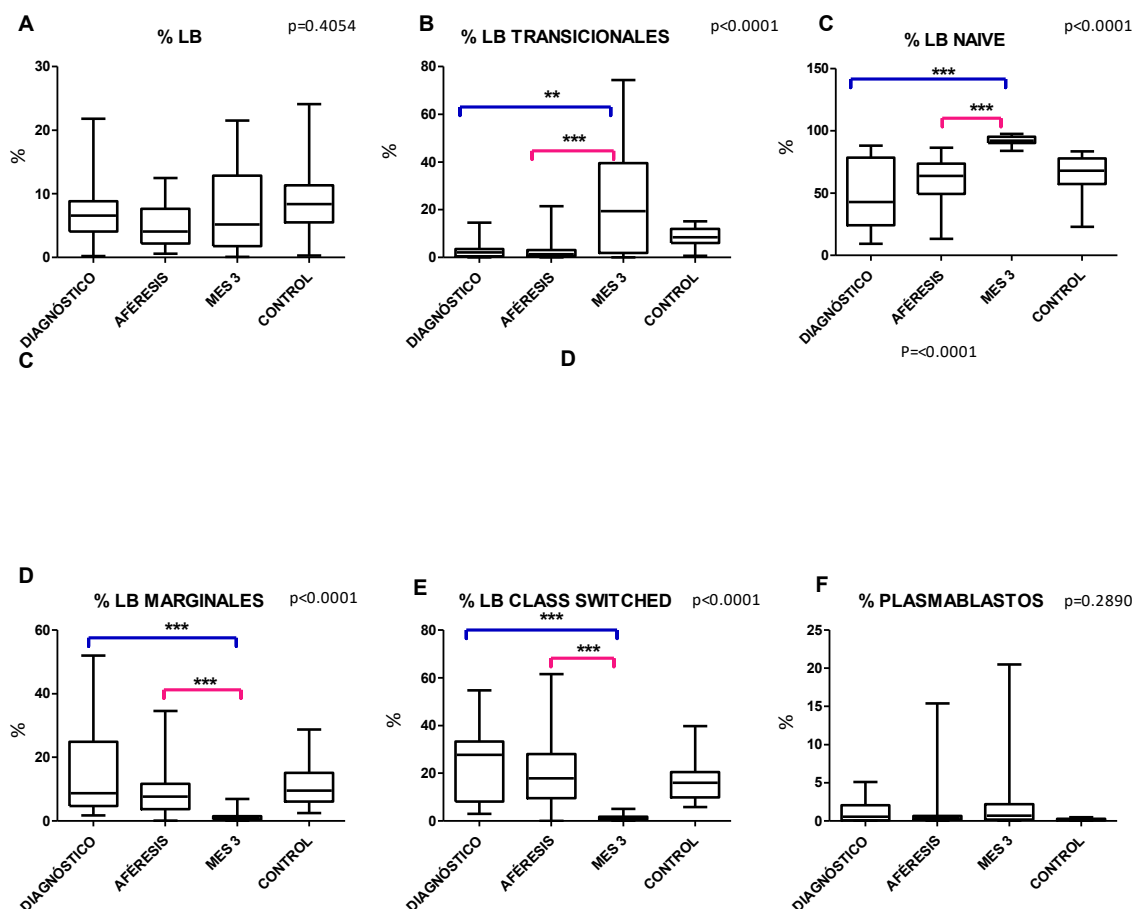


**Figura 27.** Distribución de células Treg en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM (n=20), aféresis (n=28) y MM tras TASPE (n=31). (A, B,) Proporciones de células T CD4+ naturales (CD4+CD25+CD127-) y CD8+ naturales (CD8+CD25+CD127-). Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y \*\*\* si  $p < 0.001$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 3.2.3 Caracterización de linfocitos B

Como se observa en la figura 28, las aféresis de los pacientes de MM no difirieron en las subpoblaciones de LB con respecto de los pacientes con diagnóstico reciente de MM.

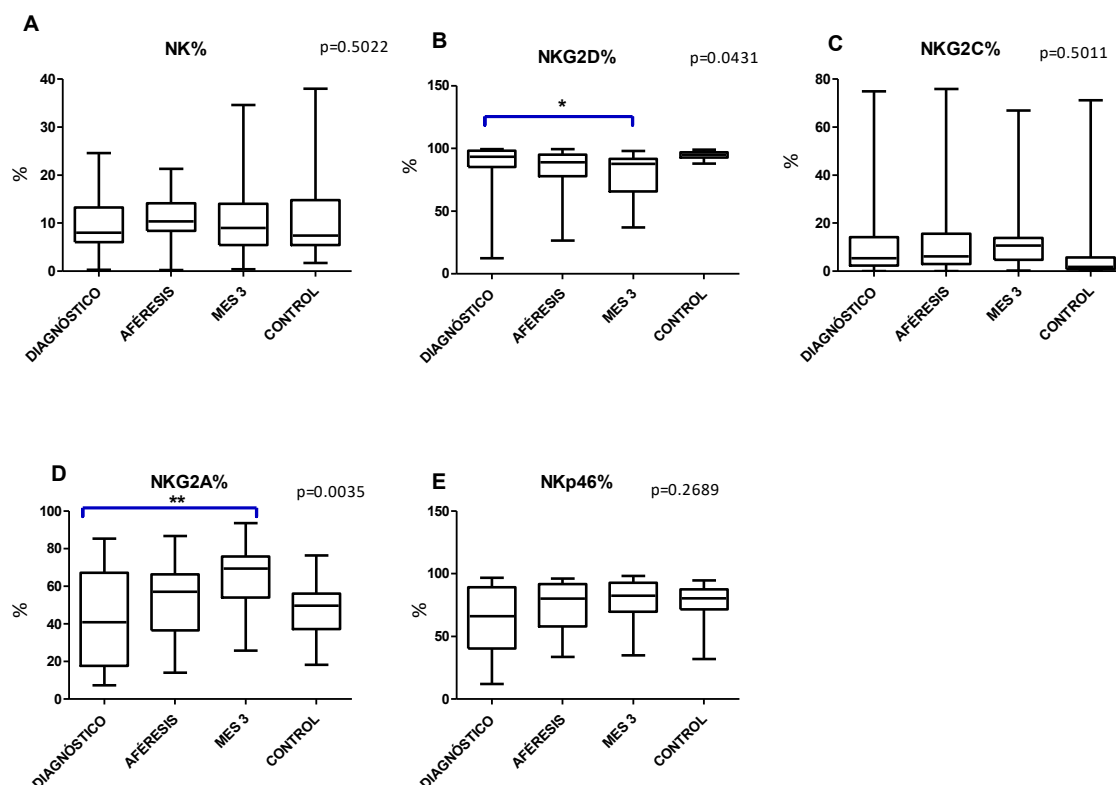
Por otro lado, observamos un aumento de la proporción de LB transicionales (figura 28B) y LB *naïve* (figura 28C) así como una disminución en la proporción de LB de memoria marginales (figura 28D) y LB con cambio de clase (figura 28E) en los pacientes recién trasplantados con respecto a la aféresis.



**Figura 28.** Distribución de células B en sangre periférica de pacientes al diagnóstico con MM (n=20), aféresis (n=28) y MM tras TASPE al mes 3 (n=31). (**A, B, C, D, E, F**) Proporción de células B totales, transicionales (CD27-CD10+CD38+), *naïve* (CD27-IgD+IgM+), marginales (CD27+IgD+IgM+), de cambio de clase (CD27+IgD-IgM-) y plasmablastos (CD20-CD27++CD38++). Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p<0.05$ , \*\* si  $p<0.01$  y \*\*\* si  $p<0.001$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 3.2.4 Caracterización de células NK

Como se observa en la figura 29, las aféresis de los pacientes con MM no presentan diferencias significativas en el porcentaje de células NK ni en la expresión de sus marcadores. Sin embargo, sí que observamos un aumento de la expresión del marcador de inhibición NKG2A (figura 29D) en el mes 3 respecto del basal, unido a una disminución del marcador de activación NKG2D (figura 29B).



**Figura 29.** Distribución de células NK en sangre periférica de pacientes con MM (n=20), aféresis (n=28) y pacientes con MM tras TASPE al mes 3 (n=31). (A, B, C, D, E) Proporción de células NK totales NKG2C, NKp46, NKG2A y NKG2D del total de células NK. Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis con el test a posteriori de Dunns, indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y \*\*\* si  $p < 0.001$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

#### 4. Caracterización de la reconstitución inmunitaria en las recaídas

En esta última parte de la tesis quisimos identificar biomarcadores de reconstitución inmunitaria que pudieran servir para identificar aquellos pacientes que acaban recayendo. Para ello, se dividieron los pacientes estudiados en la cohorte de la reconstitución inmunitaria en dos grupos diferentes: los que recayeron y los que permanecieron en remisión completa posTASPE, con el fin de evaluar, en una primera aproximación, las posibles diferencias en la calidad de la reconstitución inmunitaria en los pacientes en recaída y en remisión completa. Es importante señalar que se estudiaron los pacientes hasta el mes previo en el que recaen y por tanto todos los parámetros estudiados corresponden a momentos temporales en los que el paciente todavía está en RC.

##### 4.1 Caracterización de los pacientes

###### 4.1.1 Pacientes que recaen

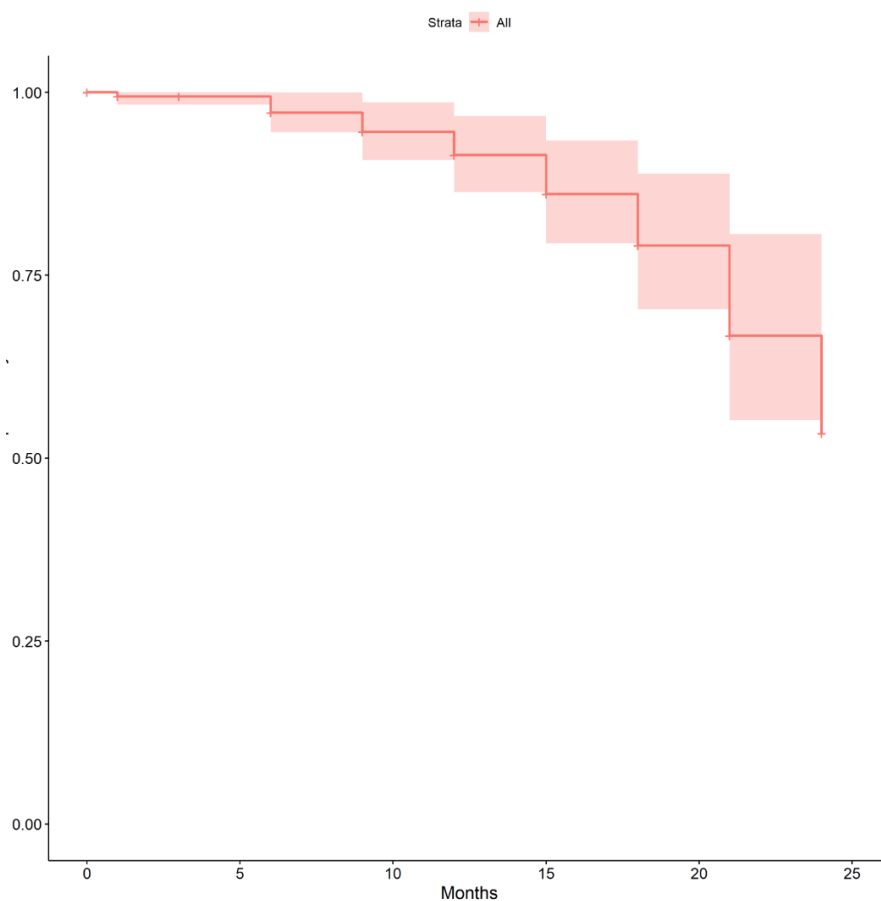
Se trababa de 10 pacientes con MM tratados con TASPE (4 hombres y 6 mujeres). La mediana de edad de los pacientes fue 59 años y los subtipos de MM en este grupo fueron 4 MM tipo IgGκ, 1 IgGλ, 3 IgAκ, y 2 BJλ. Las demás características de los pacientes y detalles de la terapia se resumen en la tabla 4.

###### 4.1.2 Pacientes en remisión

Los pacientes que permanecían en remisión al final del seguimiento fueron 13 pacientes con MM tratados con TASPE (9 hombres y 12 mujeres). La mediana de edad de los pacientes fue 60.5 años y los subtipos de MM en este grupo fueron 4 MM tipo IgGκ, 3 tipo IgGλ, 1 IgAκ, 2 IgAλ, 1 BJκ, 2 BJλ. Las demás características de los pacientes y detalles de la terapia se resumen en la tabla 4.

## 4.2 Estudio de Kaplan Meier del análisis de las recaídas

En total se analizaron 31 pacientes, con pérdida de seguimiento en 8 de ellos por continuar su seguimiento postTASPE en otros centros. Trece pacientes continúan en remisión completa hasta los 24 meses y se produce la recaída en 10 pacientes. La mediana de recaída es el mes 15.



**Figura 30: Representación el análisis de Kaplan Meier.** Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión en pacientes con MM postTASPE (N=31).



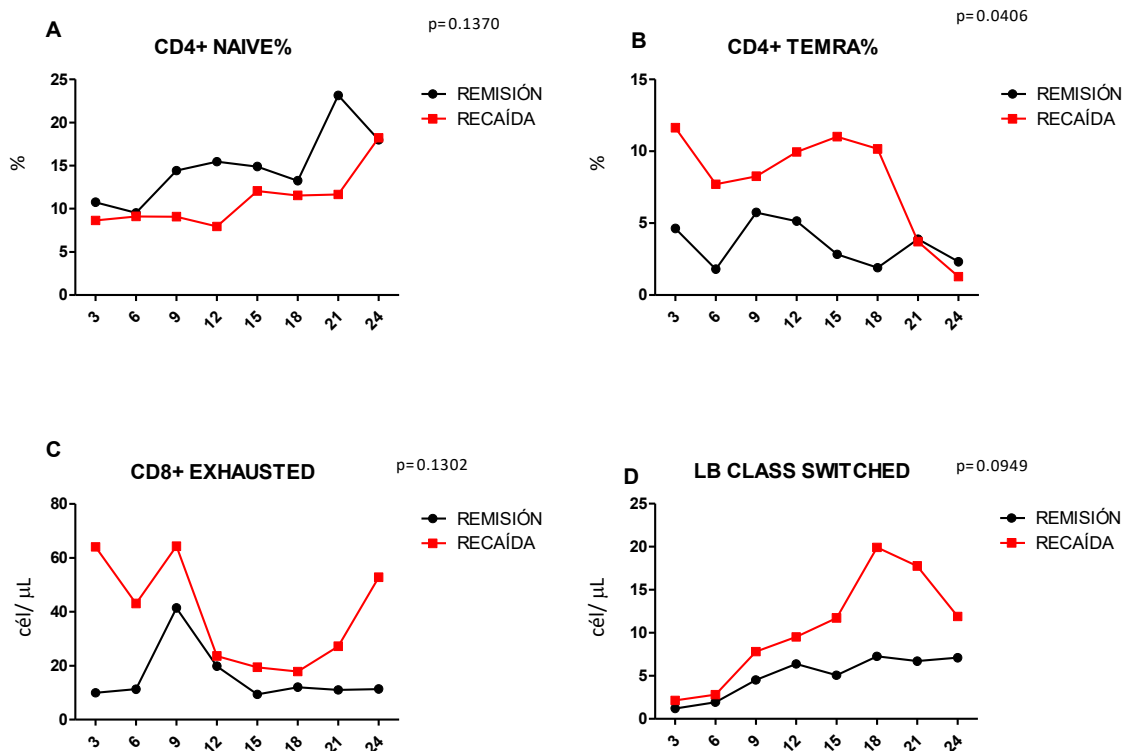
### 4.3 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias y de las inmunoglobulinas en sangre periférica en las recaídas

#### 4.3.1 Caracterización de linfocitos T y B

*Las recaídas de pacientes con MM tras TASPE se caracterizan por un aumento del porcentaje de la subpoblación de linfocitos T CD4+ TEMRA y por un aumento de los valores absolutos de la subpoblación de LB memoria con cambio de clase.*

Los pacientes que recaen tras TASPE se caracterizan por una reconstitución inmunitaria con una menor proporción de la subpoblación de LT CD4+ *naïve* (figura 31A) junto con un aumento de la proporción de LT CD4+ TEMRA con respecto a los que no recaen (figura 31B). También observamos un aumento en los valores absolutos de LT CD8+ exhaustos (figura 31C). En el caso de la proporción de LT CD4+ *naïve* y en los valores absolutos de LT CD8+ exhaustos, las diferencias observadas no llegan a ser estadísticamente significativas.

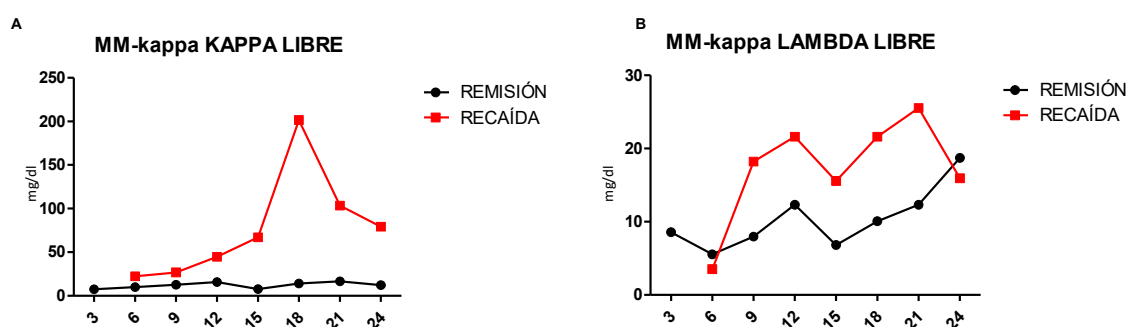
En lo que respecta a los LB, observamos que los pacientes que recaen se caracterizan por una reconstitución inmunitaria con un aumento de los valores absolutos de los LB de memoria con cambio de clase (figura 31D).



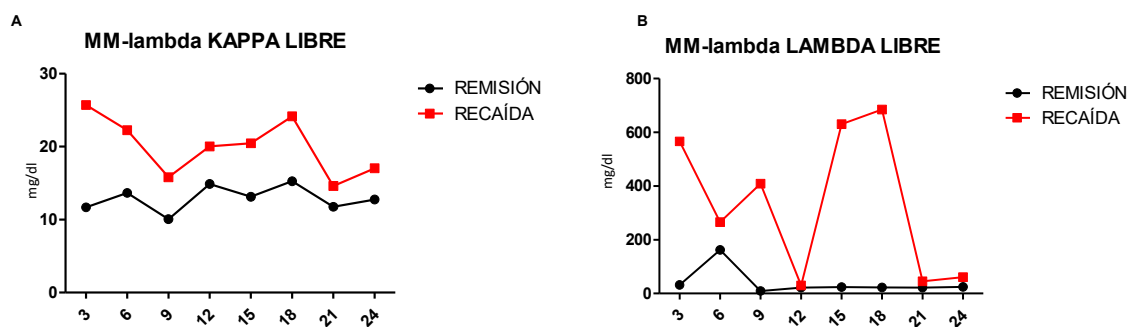
**Figura 31.** Evaluación de la distribución de los LT y B de sangre periférica de pacientes con MM tras TASPE que recaen (n=10) y pacientes en remisión (n=13). (A, B, C, D) Proporción de células T CD4+ (CD3+CD4+) *naïve* (CD27+CCR7+CD45RA+) y TEMRA (CD27-CCR7-CD45RA+) del total de células CD4+, valores absolutos de células T CD8+ (CD3+ CD8+), exhaustas (CD8+CD28-CD57+CD279+) y de la subpoblación de LB de memoria con cambio de clase (CD27+IgD-IgM-). Las distintas subpoblaciones se identifican gracias a la expresión diferencial de las moléculas entre paréntesis analizadas por citometría de flujo. El valor “p” indicado en la figura corresponde al resultado del GEE, teniendo en cuenta la variación en el tiempo de la medida y el outcome. Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

#### 4.3.2 Caracterización de las inmunoglobulinas

Cuando comparamos la reconstitución de la inmunidad humoral, encontramos diferencias significativas en los niveles de las cadenas ligeras libres, tanto kappa como lambda, entre los pacientes que recaen y los que permanecen en remisión (figuras 32 y 33). Este aumento se observa en los distintos tipos de MM.



**Figura 32.** Evaluación de la concentración de las cadenas ligeras (mg/dL) en las recaídas en suero de pacientes con MM de tipo kappa tras TASPE que recaen (n=8) y pacientes en remisión (n=6). (A) Concentración de cadena ligera kappa libre y (B) concentración de cadena ligera lambda libre. Las escalas varían dependiendo de cadena ligera libre analizada.



**Figura 33.** Evaluación de la concentración de las cadenas ligeras (mg/dL) en las recaídas en suero de pacientes con MM de tipo lambda tras TASPE que recaen (n=4) y pacientes en remisión (n=7). (A) Concentración de cadena ligera kappa libre y (B) concentración de cadena ligera lambda libre. El valor "p" indicado en la figura corresponde al resultado del GEE, teniendo en cuenta la variación en el tiempo de la medida y el outcome. Las escalas varían dependiendo de la cadena ligera libre analizada.

#### 4.4 Identificación de variables de la reconstitución inmunitaria predictoras de recaída.

Con el fin de identificar posibles biomarcadores inmunitarios de recaída, realizamos una regresión de COX. En nuestro estudio observamos que el porcentaje de células NK NKG2D+ proporciona un valor protector a los pacientes de MM tras TASPE: con una mayor proporción de células NK NKG2D+ existiría un menor riesgo de recaídas y, por lo tanto, probablemente una mayor supervivencia.

VARIABLE	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z )
% CD4 TEMRA	0.042356	1.043266	0.028493	1.487	0.1371
% CD8 EXHAUSTOS	0.011062	1.011123	0.282211	0.039	0.9687
% LB NAIVE	0.037862	1.038588	0.064609	0.586	0.5579
VALORES ABSOLUTOS LB CAMBIO DE CLASE	0.012464	1.012542	0.030455	0.409	0.6824
% CAMBIO DE CLASE	0.082917	1.086451	0.139944	0.592	0.5535
% NK NKG2D+	-0.041931	0.958936	0.017369	-2.414	0.0158 *

Tabla 7. Resultados de la regresión de Cox.

## DISCUSIÓN

El MM supone el 1% de todos los cánceres y es la segunda neoplasia hematológica más frecuente después del linfoma. Uno de los sellos distintivos de las células cancerígenas es su capacidad para evitar su eliminación por parte del sistema inmunitario. La interacción entre el sistema inmunitario y las CPM está descrita en todas las discrasias de CP, incluidos los estadios asintomáticos, como la GMSI. Aunque en las primeras etapas del desarrollo tumoral el sistema inmunitario parece eliminar eficazmente las CPM, o al menos las mantiene en un estado de latencia, las CPM finalmente consiguen evadir la vigilancia inmunitaria y la GMSI progresa hacia MM (63–65). Estas fases de eliminación, equilibrio y evasión conforman la inmuoedición, un concepto relativamente reciente, muy bien descrito en tumores sólidos (166), y que tiene al MM como su paradigma en los tumores hematológicos. Así, la participación de los LT en el control de la progresión de la GMSI hacia MM se describió ya hace muchos años cuando Corso *et al.* (167) demostraron una disminución de LT-CD4+ en la médula ósea de los pacientes con MM comparado con los pacientes con GMSI, así como una disminución de esos mismos linfocitos a medida que progresa la enfermedad. Desde entonces, distintos estudios, con metodologías diversas, han ido caracterizando la inmuoedición del MM(63–65),(168) mecanismo que seguramente también subyace en las recaídas postTASPE (figura 2) (55).

Por ello, en esta tesis hemos querido profundizar en el conocimiento del estado del sistema inmunitario en los pacientes con MM, tanto en el momento del diagnóstico como durante la recuperación de la competencia inmunitaria postTASPE, con el fin de comprender mejor la fisiopatología de esta enfermedad e identificar, en SP, biomarcadores de pronóstico y terapéuticos que mejoren el manejo clínico de estos pacientes, su calidad de vida y su supervivencia.

## **1. Respuesta del sistema inmunitario al MM.**

Cuando comparamos las subpoblaciones linfocitarias de SP de sujetos sanos y de pacientes con MM con diagnóstico reciente, observamos una disminución de los valores absolutos de los linfocitos totales y LT-CD4+. Además, detectamos una redistribución de las subpoblaciones de LT-CD8+ que se caracteriza por una disminución en los valores absolutos y el porcentaje de los LT-CD8+ *naïve*. Por el contrario, la subpoblación de LT exhaustos se vio aumentada en valores absolutos, tanto en el caso de los LT-CD4+ como en los LT-CD8+, y la misma tendencia observamos con los LTreg. En cuanto a los linfocitos B, observamos un descenso de los LB *naïve* totales y de los LB transicionales, tanto en valores absolutos como en porcentaje. Finalmente, no encontramos diferencias sustanciales en los valores de linfocitos Treg y células NK, aunque sí una tendencia hacia el aumento en el caso de los primeros.

Los hallazgos que hacen referencia a las principales subpoblaciones linfocitarias como LT-CD4+, LT-CD8+ y LB totales coinciden con los de estudios previos (169),(170),(171),(172). En dichos estudios, además, identifican los bajos valores absolutos de los LT totales, LT-CD4+ y LB como un factor predictor de menor supervivencia libre de progresión y menor supervivencia global. Nosotros no hemos realizado este tipo de análisis debido, entre otras cosas, al corto periodo de tiempo que ha transcurrido desde el estudio de las subpoblaciones linfocitarias al diagnóstico hasta el momento de la escritura de esta tesis. Sin embargo, es un análisis pendiente que tenemos que abordar próximamente por varias razones: i) esta tesis constituye, hasta donde sabemos, el primer estudio de este tipo en el que además de las principales subpoblaciones linfocitarias, también se incluyen los distintos estadios de diferenciación, tanto de LT como de LB, cuya relevancia en la patogénesis y el pronóstico todavía está por definir; ii) la inmensa mayoría de los trabajos realizados en este sentido (como los citados unas líneas más arriba) son bastante antiguos y por tanto el valor pronóstico de las subpoblaciones linfocitarias puede haber cambiado al haberse modificado sustancialmente al abordaje terapéutico del MM; iii) puede aportar valor pronóstico y se podría aplicar en la estratificación de riesgo de los pacientes con MM.

Desde el punto de vista patogénico, nuestros hallazgos sugieren que el MM cursa con una disminución del repertorio de reconocimiento antigénico como consecuencia del descenso de los linfocitos T naïve y B naïve, lo que, probablemente, compromete una defensa efectiva en el control del crecimiento del tumor. Por su parte, el aumento de LT exhaustos, en probable relación con la estimulación crónica del sistema inmunitario por los propios antígenos tumorales y las infecciones intercurrentes, pone de manifiesto un sistema inmunitario agotado en la lucha contra dicho tumor. Está descrito que los LT-CD8+ exhaustos aumentan la producción de la citocina inmunosupresora IL-10, lo que se asocia con un peor pronóstico y un mayor crecimiento tumoral (173). En la actualidad se está estudiando cómo abordar este aumento de producción de IL-10 (174). Estos LT exhaustos expresan uno de los principales checkpoints del sistema inmunitario, la molécula PD-1: un receptor que inhibe las funciones de los LT efectores a través de su interacción con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 expresados por las células presentadoras de Ag. Se da el caso de que las CPM también expresan PD-L1 y PD-L2 y por tanto son capaces de inhibir la activación de los LT PD-1+ (175,176).

A pesar de ello, los anticuerpos anti-PD-1 como nivolumab o pembrolizumab no han resultado ser muy eficaces en monoterapia (177). En la actualidad se están probando en combinación con otros fármacos para definir mejor cuáles son las combinaciones más eficaces y la ventana temporal óptima para su administración(178),(179). En este sentido, a pesar del papel aceptado de los LT exhaustos en la patogénesis del MM y las opciones terapéuticas que de ello deriva, apenas hay estudios que, como el nuestro, confirmen su aumento en la SP de estos pacientes en el momento del diagnóstico (180) ni si su expresión puede condicionar la respuesta terapéutica a los inhibidores de PD-1. Es importante señalar también en este punto que en estudios futuros será necesario incorporar al estudio de los LT exhaustos otras moléculas inhibidoras como TIGIT o LAG-3, cuya expresión conjunta define mejor el estadio de LT exhausto y que también parecen aumentar en los LT de los pacientes con MM, según indican estudios preliminares(181).

Finalmente, en lo que a los LTreg se refiere, hemos encontrado también un aumento en el número de estas células, sobre todo en el porcentaje de las mismas, que no llega a ser significativo en probable relación con el escaso número de pacientes estudiados y la variabilidad interindividual de esta subpoblación. No obstante, este aumento ha sido ya descrito en estudios anteriores y su magnitud se ha asociado a supervivencia (182),(183). Por otra parte, fármacos como los IMiDs inhiben la proliferación y función de las Treg(184); además, su elevada expresión de CD38 las convierte también en una óptima diana terapéutica para los anticuerpos dirigidos contra esa molécula(185). Todo ello confirma la utilidad de la cuantificación de los LTreg.

En cuanto al linaje B, los pacientes con MM recién diagnosticados presentan un descenso de LB totales a expensas de una importante disminución de las células B transicionales y *naïve*, que probablemente refleja la inhibición de la linfopoyesis B normal de médula ósea. Esta reducción de la linfopoyesis B puede estar en relación con la competición de las CPM por los nichos de maduración de las células B normales, así como con la producción de factores solubles por parte de las CPM y de las células estromales de médula ósea que inhiban la proliferación o incluso induzcan la apoptosis de los progenitores B normales. Al igual que sucedía con los LT, la notable disminución en el aporte de LB transicionales y *naïve*, contribuye al empobrecimiento de la respuesta antitumoral y antiinfecciosa, así como en último término a la inmunoparesia, que constituye una de las señas de identidad del MM.

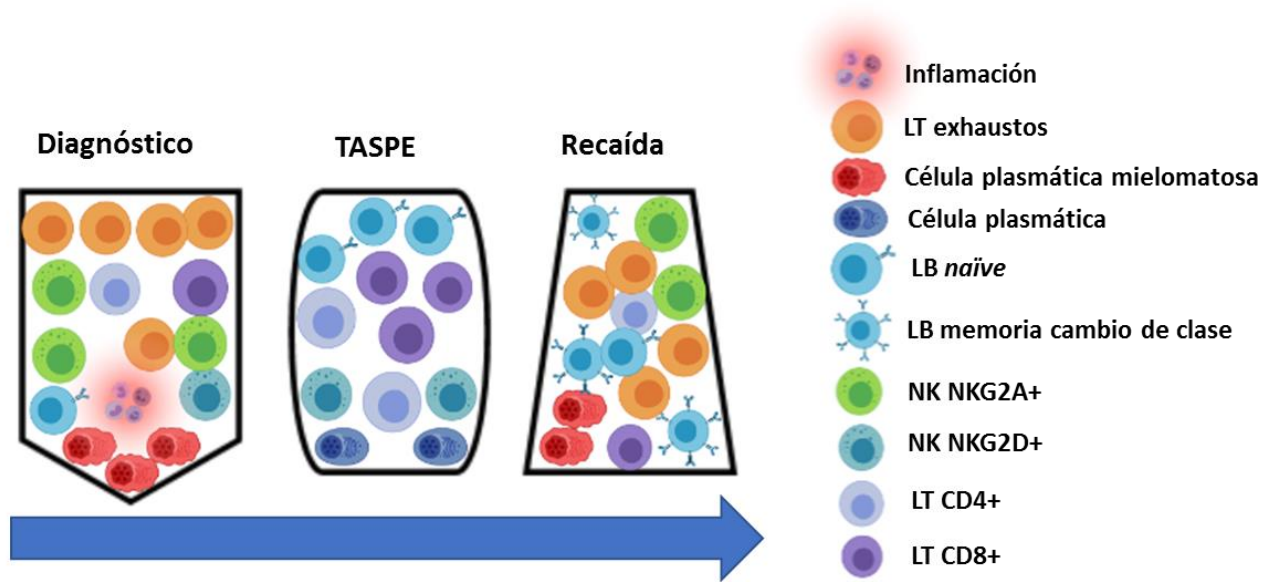
Nuestros hallazgos, en cuanto a los LB se refiere, coinciden con los de análisis previos (186),(187),(188) aunque son estudios bastante antiguos en los que la caracterización fenotípica de los LB no se realiza exactamente igual y no es tan exhaustiva como la del nuestro.



Curiosamente, detectamos también un aumento de plasmablastos en SP. Una posibilidad es que se tratase de CPM circulantes, pero son CP con un fenotipo completamente normal CD38++CD20-CD19+CD27++CD45+. Una posible explicación es que dicho aumento sea consecuencia de la respuesta inmunitaria antitumoral que probablemente se esté desarrollando a nivel de los órganos linfoides secundarios. Alternativamente, este aumento puede estar provocado por la imposibilidad de las células plasmáticas normales de colonizar la médula ósea debido a la importante infiltración tumoral de la misma. En ese sentido, sería muy interesante correlacionar la cantidad de LB y CP normales con las CPM circulantes porque probablemente nos dé pistas sobre el estadio y el pronóstico del paciente, tal y como sucede para la proporción de CP normales y mielomatosas en médula ósea(189). Es posible que una caracterización más detallada de estos plasmablastos normales nos dé pistas sobre las causas de su aumento y también sobre su función. Para ello deberíamos realizar una tinción con anticuerpos que reconozcan las distintas inmunoglobulinas de superficie con sus correspondientes subtipos, así como receptores de *homing* como los receptores de quimiocinas, entre otros abordajes.

Nosotros, al igual que otros autores no hemos encontrado diferencias en las células NKs totales de pacientes con MM y controles(190),(75),(191),(192) pero sí una tendencia a la disminución de los valores absolutos de las células NK NKG2D+, una subpoblación cuya actividad anti-mieloma está demostrada y cuya disminución es un hallazgo consistente entre los distintos estudios (65),(73),(193),(194). Recordemos que el ligando de NKG2D, la molécula MICA, se expresa en las CPM y que su pérdida por mecanismos diversos constituye uno de los mecanismos de evasión tumoral mejor caracterizados en MM (75). Hoy en día sabemos que gran parte de los fármacos que empleamos en MM aumentan la expresión del ligando de NKG2D y de DNAM (otra molécula con actividad anti-mieloma expresada por las células NK) a través de mecanismos diferentes, pero también que la quimioterapia puede disminuir sus niveles (195). Es por todo ello que son necesarios más estudios en los que se indague los efectos de los distintos fármacos en la expresión de estas moléculas y de sus ligandos, ya que parecen jugar un papel fundamental en la vigilancia inmunitaria del MM, tal y como veremos más adelante también en el contexto de las recaídas postTASPE.

A modo de resumen de los principales hallazgos de esta parte de la tesis incluimos la siguiente figura:



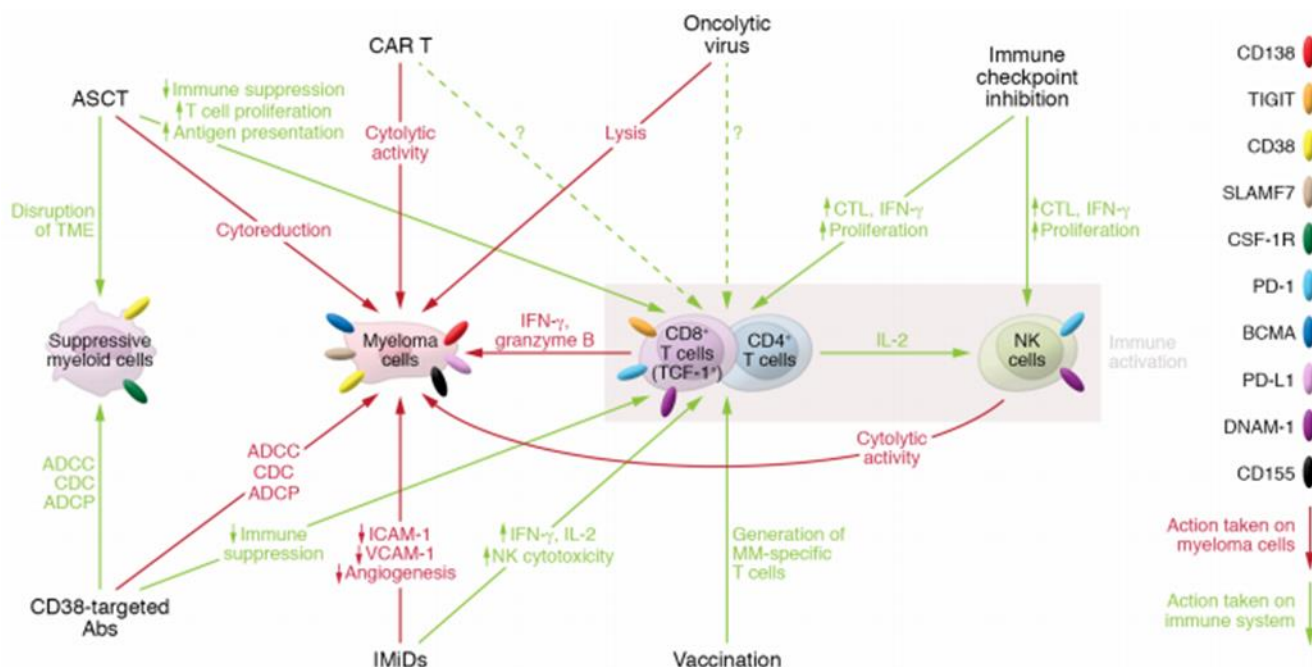
**Figura 34. Esquema de los cambios en el sistema inmune desde el diagnóstico de mieloma múltiple hasta la recaída.** Imagen adaptada de *Early alterations in stem-like/marrow-resident T cells and innate and myeloid cells in preneoplastic gammopathy*(65). Figura creada utilizando biorender.com.

Es importante señalar que, a día de hoy, no podemos distinguir hasta qué punto las alteraciones del sistema inmunitario son responsables de la progresión desde GMSI hasta MM o son las alteraciones que se van acumulando en las CPM las que llevan a una inmunosupresión y por tanto a la pérdida de la vigilancia del sistema inmunitario y la progresión tumoral.

Nuestros resultados sugieren que las alteraciones del sistema inmunitario que detectamos en SP muy probablemente reflejan el grado de inmunosupresión en el microambiente medular. Sería muy interesante realizar este tipo de análisis en la SP de los pacientes con GMSI, junto con el resto de determinaciones que se hacen durante su seguimiento, para identificar el riesgo de progresión hacia MM. La presencia de CPM circulantes permitiría además una caracterización de las alteraciones genéticas que vayan acumulando y su correlación con el perfil inmunitario de SP, sin necesidad de recurrir al aspirado de médula ósea.

En síntesis, una mayor y mejor comprensión de la inmunoección en el contexto de las gammopatías monoclonales, del estatus inmunitario con el que cada paciente llega al diagnóstico, y de los efectos inmunomoduladores de los fármacos, permitirá afinar en la selección de las ventanas de oportunidad tanto para los tratamientos dirigidos como para la inmunoterapia e identificar nuevas

dianas terapéuticas que añadirán alternativas al actual arsenal terapéutico, tal y como propone y resume la figura 37.



**Figura 35. Inmunoterapias para el mieloma múltiple.** La inmunoterapia contra el mieloma se dirige contra el tumor en sí, las poblaciones mieloides supresoras y/o a las células inmunitarias. Los AcMo anti-CD38 se dirigen contra células de mieloma que expresan CD38. El TASPE altera el microambiente tumoral, elimina directamente las células de mieloma y promueve las células T efectoras antimieloma. Las células T-CAR y los virus oncolíticos promueven la lisis de las células de mieloma. Los inhibidores de los *checkpoints* inmunitarios y la vacunación contra el cáncer mejoran directamente las respuestas antimieloma mediadas por células T y NK. Los fármacos IMiD inhiben el crecimiento de las células de mieloma, reducen la angiogénesis y promueven la activación de las células inmunitarias. Imagen adaptada de *Immunotherapy of multiple myeloma*(231).

## 2. Reconstitución inmunitaria

El estudio de la reconstitución inmunitaria postTASPE surgió de un trabajo anterior del grupo en el que demostrábamos un perfil inmunitario característico de los pacientes que llevaban en RC más de 6 años. Con la presente tesis pretendíamos dilucidar si dicho perfil es específico de ese tipo de pacientes y por tanto sería el estatus inmunitario “ideal” al que deberíamos aspirar para nuestros pacientes, o si, por el contrario, obedece a un patrón de reconstitución inmunitaria común a todos los individuos trasplantados. Con este objetivo hemos caracterizado la reconstitución de las subpoblaciones de LT, LB y células NK en los pacientes con MM en los dos primeros años postTASPE;

con la finalidad adicional de identificar un perfil inmunitario característico que pudiera emplearse como marcador relevante en la predicción del pronóstico y, de la calidad y duración de la respuesta en estos pacientes.

La regeneración de un sistema inmunitario funcional y competente requiere la reconstitución de la inmunidad innata y la adaptativa. De cara a la discusión de nuestros datos, brevemente recordaremos el posible origen de las células inmunitarias que se recuperan tras el trasplante: i) células maduras del sistema inmunitario del paciente que sobreviven a los regímenes de quimioterapia preTASPE; ii) células maduras del sistema inmunitario del donante presentes en el producto de aféresis; iii) progenitores hematopoyéticos presentes en el producto de aféresis; iv) progenitores hematopoyéticos residuales del paciente.

En nuestro estudio encontramos que los linfocitos NK se encuentran entre las primeras células en recuperarse después del trasplante. También encontramos una reconstitución temprana de los LT-CD8+ y los LB, y por el contrario un importante retraso en la recuperación de los valores normales de los LT-CD4+, de acuerdo con lo publicado previamente por otros grupos (196),(197),(198),(199),(200),(201),(202),(203).

Sin embargo, en nuestra opinión, es necesario estudiar también las principales subpoblaciones funcionales de cada uno de los distintos tipos linfocitarios, porque de lo contrario es imposible entender las características reales de la recuperación inmunitaria ni deducir sus consecuencias en términos de pronóstico. En este sentido, llama mucho la atención que en la era de la inmunoterapia se hayan dejado de abordar este tipo de análisis que sin embargo proliferó a finales de los 90 cuando la tecnología y la disponibilidad de inmunoterapias eran muy limitadas. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de reconstitución inmunitaria postTASPE en MM en el que se diseccionan en detalle todos los estadios madurativos de los LT y los LB así como las principales subpoblaciones de células NK. A continuación, iré discutiendo en detalle el significado de los principales hallazgos.

En el caso de los LT-CD4+ totales observamos una disminución de sus valores relativos y absolutos que no llegan a recuperarse tras 2 años postTASPE. Con el tiempo llegarán a cifras cercanas a las normales, como hemos visto en los pacientes LTCR (86). Esta disminución es debida, entre otras posibles razones, a la recuperación deficitaria de los valores absolutos de los LT-CD4+ *naïve* y TCM, que al igual que sucede con su población “madre” (los LT-CD4+ totales) nunca llegan a alcanzar

valores de normalidad. De forma especular, en los primeros meses postTASPE hay un predominio de las distintas subpoblaciones de LT-CD4+ de memoria efectores.

Por su parte, los LT-CD8+ totales se recuperan de forma temprana. Sin embargo, su subpoblación *naïve* tampoco se recuperará nunca de forma completa, tal y como observamos en los pacientes LTCR (86). Al igual que en los LT-CD4+, la reconstitución temprana está dominada por los estadios de memoria.

Estos hallazgos hay que ponerlos en el contexto de la homeostasis normal de los LT. La reconstitución de células T ocurre a través de dos vías, una vía dependiente del timo y otra independiente, derivada de la expansión periférica de células T maduras que sobreviven a la quimioterapia y/o están contenidas dentro de la infusión de linfocitos(152). La existencia de la expansión periférica está descrita hace tiempo(204) y se ha demostrado que, a diferencia de la timopoyesis, genera un grupo de células T con deficiencias tanto cuantitativas como cualitativas que dan lugar a una inmunidad funcional deficitaria (205),(206). Un factor que contribuye a la efectividad limitada de la expansión periférica es la pérdida de células T debido a una alta tasa de apoptosis(206),(207). Además, a diferencia del amplio repertorio de células T que se genera a través de la timopoyesis, el repertorio de células T que se genera durante la expansión periférica está restringido por las especificidades del TCR contenidas en la inóculo inicial(208). Gracias a esta expansión periférica se puede preservar el repertorio *naïve* en ausencia de timopoyesis, si bien no comprenda un repertorio antigénico equiparable al generado por una timopoyesis eficaz (152),(209),(210).

La recuperación de los valores normales de LT-CD8+ tras el trasplante autólogo tiene lugar de forma muy rápida, aproximadamente transcurrido un mes postTASPE(211), lo que indica que su regeneración depende de aquella expansión extra-tímica. El tratamiento de inducción previo a la recolección de la aféresis provoca un daño tímico que justifica que en la aféresis, y sobre todo en el mes 3 postTASPE, predominen los estadios madurativos que no dependen del timo para su regeneración como son los LT de memoria efectores. Debido a que las células T CD8+ derivan predominantemente de la expansión clonal que ocurre fuera del timo (212), la recuperación de las células T CD8+ totales no se ve afectada por el envejecimiento ni por los efectos de la quimioterapia sobre este dicho órgano linfóide(213). No ocurre sin embargo lo mismo con los LT-CD8+ *naïve* que sí dependen del timo para su regeneración.

Por otro lado, los valores absolutos y en porcentaje de los LT-CD4+ se ven claramente disminuidos en los pacientes con MM postTASPE, lo que refleja la dependencia tímica de dichos linfocitos. Nosotros, al igual que en otros estudios de reconstitución inmunitaria(152), a los 24 meses no vemos la recuperación, y en estudios previos en pacientes LTRC tampoco se observó(86). Es posible, al igual que ocurre con otras enfermedades hematológicas tratadas con trasplante, que estos niveles no se lleguen a recuperar, muy probablemente debido al daño tímico ocasionado durante la inducción y acondicionamiento preTASPE y a la reducida timopoyesis asociada a la edad de los pacientes (152),(156). Esta teoría la avalan los resultados del estudio de las aféresis, donde el porcentaje de los LT-CD4+ *naïve* es incluso más bajo que el presentan los pacientes al diagnóstico.

Además de la recuperación de las cifras de LT-CD4+ y LT-CD8+ también quisimos evaluar la competencia funcional de dichos linfocitos. Para ello, llevamos a cabo experimentos de proliferación en respuesta a estimulación con anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD3 y CD28. Pudimos comprobar que el porcentaje de proliferación de los LT se va recuperando con el tiempo hasta alcanzar valores de normalidad, en consonancia con estudios previos(201),(214). No podemos detallar en qué momento se alcanza una competencia equiparable a la de los sujetos sanos ya que las diferencias no son significativas en los distintos tiempos, pero la podríamos situar en algún momento entre los 6 meses y el año. Es posible que el aumento del tamaño muestral nos permitiese afinar más dicho momento, pero la realización de este tipo de experimentos es más laboriosa que el mero inmunofenotipo por citometría de flujo y por tanto, sería más difícil establecerlo como una prueba más dentro de la rutina asistencial. Otros experimentos funcionales que también serían oportunos comprenden la producción de citoquinas y la actividad citotóxica en el caso de los LT-CD8+.

En cuanto a los linfocitos B, su reconstitución se caracteriza por una recuperación temprana, tanto del porcentaje como de los valores absolutos de los LB totales cuyos valores no difieren de los controles sanos en el mes 3 postTASPE, todo ello en concordancia con lo publicado (198), (202). Esta recuperación temprana viene dada por un aumento en el repertorio de los LB *naïve* totales y LB transicionales, unido a una importante disminución de LB de memoria marginales y memoria con cambio de clase. El aumento de las células B transicionales y *naïve* también se había descrito con anterioridad (173),(174), aunque la caracterización fenotípica no fue tan detallada como la nuestra, ni se ajusta a los consensos actuales de clasificación fenotípica de las células B (215) al tratarse de estudios bastante antiguos. Este aumento de células *naïve* está también avalado por las

características del uso del repertorio de los genes VH (216) y de una disminución de las mutaciones somáticas(217). Todo ello recuerda a la ontogenia normal de los LB y no es exclusivo del TASPE sino que lo podemos encontrar en otros contextos de reconstitución inmunitaria (218),(219),(220).

En el caso de los LB de memoria con cambio de clase, sus cifras normales no se recuperan completamente hasta pasados dos años y este retraso es todavía más acentuado en el caso de los marginales. Nuestro grupo ya observó esto mismo en pacientes de MM LTR(86), no pudiendo discernir en ese momento si estos cambios eran debidos a un perfil inmunitario que caracterizaba a los pacientes LTR o algo intrínseco al TASPE. Con este estudio evidenciamos que estos cambios en las subpoblaciones de los pacientes LTR son característicos del TASPE y se evidencian en estadios tempranos.

En síntesis, podemos concluir que tras el TASPE se produce una adecuada regeneración del repertorio de LB que sin embargo parece demorar su diferenciación y maduración, tal y como sucede en la ontogenia normal, y por tanto comprometer, en los primeros meses, la competencia funcional de la respuesta inmunitaria humoral incluyendo el desarrollo de anticuerpos de alta afinidad contra a agentes infecciosos y vacunas en los pacientes de MM postTASPE.

En lo que a la inmunidad humoral respecta, los niveles de Igs séricas permanecen bajos en los primeros 3 meses después del TASPE, durante el mismo período en el que el número de células B circulantes se reduce(173),(185) y las células B presentan baja respuesta proliferativa (174). En nuestro estudio hemos encontrado un importante retraso en la recuperación de los niveles de Igs, fundamentalmente de la IgM y la IgA. Esa disminución es menos acentuada en el caso de las IgG y curiosamente depende mucho del tipo de MM. Así, en los MM IgG la recuperación de las IgG es temprana. Sin embargo, en el caso de los MM IgA y en los Bence-Jones, la recuperación de dicha IgG no es total, lo que quizá refleje la inmunoparesia que parece anticipar las recaídas biológicas (222). Las deficiencias en la respuesta humoral en los receptores de TASPE es atribuido tanto a la disminución de la ayuda de las células T como a defectos intrínsecos de las células B(223),(224),(225). En nuestros pacientes, la falta de recuperación de la inmunidad humoral puede ser consecuencia de la ausencia de recuperación de los LB de memoria (marginales productores de IgM y con cambio de clase productores de IgG e IgA) así como de la disminución de los LT-CD4+ necesarios en el proceso de cambio de isotipo (226). Finalmente, es posible que los niveles de Ig tarden en recuperarse muchos años si tenemos en cuenta que la reconstitución del linaje B sigue el

proceso ontogénico normal y que los niños no alcanzan niveles de Igs equiparables a los de los adultos hasta pasados varios años desde el nacimiento (227).

Como mencionábamos al principio de este apartado, las células NK totales recuperan valores normales de forma temprana y de esta forma, ya en el mes 3 postTASPE, sus cifras no difieren de las de los controles sanos, ni en porcentaje ni en valores absolutos. Aunque no se traduce en diferencias en los valores absolutos, sí encontramos que los porcentajes de expresión de la molécula activadora NKG2D se van recuperando con el tiempo hasta alcanzar valores muy parecidos a los de los sujetos sanos. Por el contrario, las proporciones de la molécula inhibidora NKG2A se encuentran aumentadas en los primeros meses postTASPE para luego ir disminuyendo hasta alcanzar valores normales. Finalmente, los valores de células NK “memory-like” NKG2C+ están aumentados durante toda la reconstitución, tanto en valores absolutos como en valores relativos.

Es importante señalar que una de las principales moléculas con actividad anti-mieloma es precisamente NKG2D(73),(74) y el restablecimiento de sus valores normales subyace con toda probabilidad al estado de remisión completa en el que se mantienen los pacientes estudiados en el periodo postTASPE. Otras moléculas activadoras como CD16, 2B4 o especialmente DNAM (74)también se deberían considerar en este tipo de estudios ya que su expresión también está disminuida al diagnóstico(229) y el TASPE probablemente recupere sus valores de normalidad. En ese sentido, la valoración conjunta de la recuperación de los receptores activadores puede aportar mayor conocimiento a la patogénesis de las recaídas postTASPE y mayor valor predictor del efecto beneficioso del trasplante. La misma consideración la podemos realizar con las moléculas de “*exhaustion*” que como PD-1 está aumentada en el momento del diagnóstico.

La rápida recuperación de las células NK proporciona seguramente inmunidad frente a agentes infecciosos y la recaída en las primeras etapas postrasplante, cuando la inmunidad T todavía es deficitaria, ya que la diferenciación de las células NK tiene lugar en médula ósea y es independiente del timo.

Con todo lo manifestado previamente se pone en evidencia que la vigilancia inmunitaria sea uno de los principales objetivos de las terapias actuales debido a la asociación de la disfunción inmunitaria con el desarrollo y la progresión de la enfermedad. En este sentido, se están llevando a cabo distintas terapias celulares experimentales con células dendríticas pulsadas con Ag tumorales, LT citotóxicos y células NK autólogas expandidas *ex vivo*, células NK alogénicas con disparidad KIR, células CAR-T, etc. Además de ello, los LT y las células NK contribuyen de forma muy relevante a los



mecanismos de acción de la inmunoterapia, en particular de los fármacos inmunomoduladores y de los AcMo dirigidos frente a moléculas expresadas por las células mielomatosas (elotuzumab, daratumumab), o frente a moléculas capaces de modular el sistema inmunitario (PD-1/PDL-1) cuyo objetivo es potenciar la vigilancia inmunitaria frente a células tumorales(190),(230). No es un hallazgo casual que entre los fármacos con mayor efectividad se encuentren la lenalidomida y el bortezomib, cuya actividad anti-MM incluye la de potenciar la actividad de los diferentes linfocitos (LT citotóxicos, células NK), la inhibición de los LTreg o el bloqueo del eje PD1/PDL-1. Al mismo tiempo, estos fármacos han demostrado aumentar la actividad anti-MM de los AcMo. Actualmente hay varios ensayos clínicos disponibles que combinan distintos tratamientos, incluyendo terapias dirigidas junto con distintas formas de inmunoterapia (figura 37), con el fin de mejorar su eficacia clínica.

**Figura 36. Inducción de un microambiente inmunológico favorable tras el TASPE.** El mieloma activo se asocia con microambiente inmunosupresor e inflamatorio en la MO. En él destacan las células T exhaustas que se generan en respuesta a la exposición continuada de Ag. Tras el tratamiento con TASPE, se genera un nuevo microambiente en MO en el que desaparece la inflamación y destacan los LT de memoria promovidos por el MM. Imagen adaptada de *Immunotherapy of multiple myeloma* (231).

### 3. Factores predictores

principal factor de supervivencia en MM tanto en pacientes trasplantados como en pacientes no trasplantados, siendo un criterio relevante en la monitorización y evaluación de la respuesta (232). Sin embargo, no es posible realizar un aspirado de MO cada pocos meses.

Por todo lo anteriormente descrito, otro de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar la distribución de las subpoblaciones de LT, LB y células NK y el estado de inmunoparesia que preceden a las recaídas postTASPE, con la finalidad de identificar un perfil inmunitario característico que pudiera emplearse como un biomarcador relevante en la predicción del pronóstico y, en base a ello, plantear un tratamiento de rescate pertinente.

La recuperación temprana de las distintas poblaciones después del trasplante puede tener importantes implicaciones clínicas, tal y como se ha visto en el trasplante alogénico(211). En el caso del TASPE, los estudios en este sentido son muy escasos y se limitan al papel del recuento absoluto de linfocitos después del trasplante(233). Está demostrado que un mayor recuento de linfocitos está asociado con una mejor supervivencia global y libre de progresión en los pacientes con distintas enfermedades hematológicas, incluido el MM(234),(235),(236).

En el caso de nuestros pacientes hemos podido comprobar que la reconstitución inmunitaria de los pacientes que van a recaer se caracteriza por niveles más bajos de la subpoblación de LT-CD4+ *naïve* y mayores de LT-CD4+ TEMRA. Todo ello apunta a un sistema inmunitario menos competente, deficitario en la regeneración de LT *naïve*, con acumulación de poblaciones totalmente diferenciadas probablemente implicadas en la lucha contra el tumor. En el mismo sentido, también observamos un aumento de la subpoblación de LT-CD8+ exhaustos, cuyo valor predictor de recaídas ha sido descrito recientemente en este tipo de pacientes(144).

En el caso de los LB, obtenemos resultados parecidos: los pacientes que recaerán van acumulando LB de memoria con cambio de clase en mayor medida que los pacientes que no recaen. Por tanto, al igual que sucede en los LT, es posible que ese aumento refleje una mayor lucha antitumoral con una acumulación de células dirigidas contra Ag tumorales o de otro tipo, una menor producción de células *naïve* o ambas. A día de hoy no podemos discernir si estos hallazgos son causa o consecuencia de la recaída. En el caso de los LT-CD4 *naïve* y TEMRA me atrevería a apostar por la primera opción, habida cuenta de que las diferencias en esas poblaciones aparecen de forma muy temprana en el postTASPE.

En cualquier caso, estos datos confirman el valor de la vigilancia del sistema inmunitario en la patogénesis del MM, y que es precisamente una vigilancia de calidad uno de los principales objetivos del TASPE, ya que parece asociarse al mantenimiento de la remisión tras el trasplante.

Apoyando todo lo anterior, en el análisis de regresión de Cox, encontramos que la variable “NKG2D%” proporciona un valor protector a los pacientes de MM postTASPE, con lo que una mayor proporción de la molécula NKG2D en las células NK se asociaría con un menor riesgo de recaídas y, por lo tanto, probablemente a una mayor supervivencia.

Como indicamos en la introducción, la molécula NKG2D es un receptor de activación que se expresa en las células NKs y que une eficazmente la molécula MICA presente en las CPM, para desencadenar la actividad antitumoral de las células NK. La interacción del MICA-NKG2D parece ser uno de los principales mecanismos por los cuales las células NK matan a las CPM(75),(192),(144),(195). Durante el desarrollo del MM, las CPM promueven la eliminación de MICA y ello, a su vez, resulta en la disminución de la expresión en superficie de NKG2D. Esto provoca que las células NKs en MM pierdan la capacidad de reconocer sus objetivos y, en última instancia, se produzca un escape inmune(131). Una disminución de la molécula NKG2D como la que observamos en nuestro estudio podría ser un reflejo de la presencia de CPM en la MO y por lo tanto, una actividad tumoral activa. Sin embargo, queda por delante validar estos resultados.

En síntesis, con nuestro estudio se evidencia que las recaídas se caracterizan por una reconstitución inmunitaria que difiere de la que encontramos en la remisión. Dicha reconstitución postTASPE parece evidenciar un sistema inmunitario volcado en la lucha tumoral, como se deduce del aumento de las subpoblaciones de LT-CD4+ TEMRA y LB de memoria con cambio de clase. La validación de estos hallazgos y del valor protector de la proporción de células NK NKG2D+, abre paso a la identificación de biomarcadores pronóstico no invasivos para el seguimiento postTASPE de los pacientes MM y también a la investigación de nuevos fármacos y/o formas de inmunoterapia que nos lleven al estado inmunitario “ideal” que encontramos en los pacientes en remisión.

## CONCLUSIONES

1. Los pacientes de MM con diagnóstico reciente presentan un perfil inmunitario que se caracteriza por:
  - a. Un menor número de linfocitos totales y de LT CD4+ así como una disminución de LT *naïve* y un aumento de LT exhaustos, tanto en la subpoblación T CD4+ como T CD8+, que pone en evidencia un estado de desgaste del sistema inmunitario.
  - b. Una mayor proporción de LTreg CD8+ que no se traduce en un aumento de su valor absoluto, en relación con un estado de inmunosupresión.
  - c. Una disminución de los LB transicionales y *naïve* que refleja una inadecuada homeostasis humoral.
2. La reconstitución inmunitaria de los pacientes con MM tras TASPE se caracteriza por:
  - a. Un menor número de LT-CD4+ totales cuyas cifras no se recuperan hasta pasados 2 años.
  - b. Una recuperación muy deficitaria de la subpoblación *naïve*, tanto de los LT CD4+ como de los T CD8+, poniendo en evidencia la importancia de la timopoyesis en la reconstitución inmunitaria y el déficit de diversidad del repertorio antigénico resultante.
  - c. Un aumento de los LB transicionales y de los plasmablastos junto con una marcada disminución de los LB de memoria, tanto marginales como con cambio de clase. Esta reconstitución recuerda la ontogenia de los LB y evidencia el potencial de una adecuada recuperación de la homeostasis humoral.
  - d. Una recuperación deficitaria de IgM e IgA hasta pasados varios meses tras el trasplante, en probable relación con los hallazgos del punto anterior.
  - e. Una redistribución de las proporciones de las subpoblaciones NK con aumento de las NKG2D+ y una disminución de las NKG2A+, que no se traduce en diferencias en los valores absolutos.
3. La reconstitución inmunitaria de los pacientes que recaerán tras tratamiento con TASPE se caracteriza por un aumento de la proporción de los LT-CD4+ TEMRA y un aumento no significativo de los LT-CD8+ exhaustos y LB de memoria con cambio de clase, junto con una disminución no significativa de la proporción de LT-CD4+ *naïve*, que pone de manifiesto la importancia de la inmunovigilancia en el mantenimiento de la RC.

4. La proporción de células NK NKG2D+ es un factor protector frente a la recaída, lo que evidencia la relevancia antitumoral de esta subpoblación en el MM.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet*. 2021;397(10272):410–27.
2. Drayson M, Begum G, Basu S, Makkuni S, Dunn J, Barth N, et al. Effects of paraprotein heavy and light chain types and free light chain load on survival in myeloma : an analysis of patients receiving conventional-dose chemotherapy in Medical Research Council UK multiple myeloma trials. 2013;108(6):2013–9.
3. Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H, Dimopoulos MA, Blade J, Mateos M V, et al. Review article Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability : a report of the European Myeloma Network ( EMN ). 2019;118(17):4519–30.
4. SEER Cancer Statistics Review 1975-2007 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2007 National Cancer Institute. 2010;1992–2007.
5. Kuehl WM. Early Genetic Events Provide the Basis for a Clinical Classification of Multiple Myeloma. *Hematology* [Internet]. 2005;2005(1):346–52. Available from: <http://www.asheducationbook.org/cgi/doi/10.1182/asheducation-2005.1.346>
6. Agarwal A, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: A review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):985–94.
7. Health A, Squibb B, Squibb B. Daratumumab, Lenalidomide, Bortezomib, & Dexamethasone for Transplant-eligible Newly Diagnosed Multiple Myeloma: GRIFFIN. 2020;
8. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. 2019;111(5):2516–21.
9. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):375–88.
10. de Oliveira Viana IM, Roussel S, Defrène J, Lima EM, Barabé F, Bertrand N. Innate and adaptive immune responses toward nanomedicines. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.022>
11. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016;60(3):275–301.



12. Abul Abbas, Andrew H. Lichtman SP. *Inmunología celular y molecular*. 9th Editio. Elsevier; 2018. 576 p.
13. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783–801.
14. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol*. 2018;9(AUG):1–23.
15. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2019;16(5):430–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4>
16. Orrantia A, Terrén I, Astarloa-Pando G, Zenarruzabeitia O, Borrego F. Human nk cells in autologous hematopoietic stem cell transplantation for cancer treatment. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1–20.
17. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2019;25(1):13–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
18. Abul Abbas, Andrew Lichtman, Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology - 9th Edition*. 2017. p. 608.
19. Piconese S, Campello S, Natalini A. Recirculation and Residency of T Cells and Tregs: Lessons Learnt in Anacapri. *Front Immunol*. 2020;11(May):1–8.
20. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;
21. Fritsch R, Shen X, Sims G, Hathcock KS, Hodes RJ, Lipsky PE, et al. Stepwise Differentiation of CD4 Memory T Cells Defined by Expression of CCR7 and CD27. *J Immunol*. 2005;
22. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *J Immunol*. 2014;
23. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node

- homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol.* 1993;
24. D. MY, M. BT, Federica S, Mario R, Enrico L. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013;
  25. Brodie T, Brenna E, Sallusto F. Corrigendum for OMIP-018: Chemokine receptor expression on human T helper cells. *Cytom Part A.* 2013;
  26. Law H, Venturi V, Kelleher A, Mee Ling Munier C. Tfh cells in health and immunity: Potential targets for systems biology approaches to vaccination. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):1–21.
  27. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000;
  28. Golstein P, Griffiths GM. An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018;18(8):527–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0009-3>
  29. Azimi M, Aslani S, Mortezaagholi S, Salek A, Javan MR, Rezaieyemaneh A, et al. Identification, Isolation, and Functional Assay of Regulatory T Cells. *Immunol Invest.* 2016;45(7):584–602.
  30. Georgiev P, Charbonnier LM, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol.* 2019;39(7):623–40.
  31. Rouas R, Merimi M, Najjar M, El Zein N, Fayyad-Kazan M, Berehab M, et al. Human CD8+CD25+CD127 low regulatory T cells: microRNA signature and impact on TGF- $\beta$  and IL-10 expression. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):17459–72.
  32. Chiarini M, Capra R, Serana F, Bertoli D, Sottini A, Giustini V, et al. Simultaneous quantification of natural and inducible regulatory T-cell subsets during interferon- $\beta$  therapy of multiple sclerosis patients. *J Transl Med* [Internet]. 2020;18(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02329-5>
  33. Melssen MM, Olson W, Wages NA, Capaldo BJ, Mauldin IS, Mahmutovic A, et al. Formation and phenotypic characterization of CD49a, CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;7(10):1–11.

Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1490855>

34. Petkau G, Turner M. Signalling circuits that direct early B-cell development. *Biochem J*. 2019;476(5):769–78.
35. Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF, et al. Human Peripheral Blood B-Cell Compartments : A Crossroad in B-Cell Traffic. 2010;60(March):47–60.
36. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(4):959–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
37. Lebien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570–80.
38. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2203–10.
39. Toboso-Navasa A, Gunawan A, Morlino G, Nakagawa R, Taddei A, Damry D, et al. Restriction of memory b cell differentiation at the germinal center b cell positive selection stage. *J Exp Med*. 2020;217(7).
40. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, et al. Circulating human b and plasma cells. age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica*. 2010;95(6):1016–20.
41. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):244–50.
42. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 125(2):S41–52.
43. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(5):335–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3257>
44. Mailankody S, Mena E, Yuan CM, Balakumaran A, Kuehl WM, Landgren O. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(12):2159–70.
45. Bianchi G, Anderson KC. Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from

- bench to bedside, and back. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(6):422–44.
46. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, Kaiser MF, Begum DB, Dahir NB, et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. 2019;121(17):3413–20.
  47. Kumar SK, Rajkumar SV. The multiple myelomas - Current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2018;15(7):409–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0018-y>
  48. Moreau P, Rajkumar SV. Multiple myeloma—translation of trial results into reality. *Lancet*. 2016;388(10040):111–3.
  49. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):175–87.
  50. Bergsagel P, Kuehl W. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* [Internet]. 2001;20(40):5611–22. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11607813%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/sj.onc.1204641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11607813%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/sj.onc.1204641)
  51. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(5):548–67.
  52. Rajan AM, Rajkumar S V. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Nat Publ Gr*. 2015;(September):1–7.
  53. Bustany S, Bourgeais J, Tchakarska G, Body S. Cyclin D1 expression in myeloma cells alters various cell functions Cyclin D1 increases cell adhesion and migration, and chemokine secretion. 2016;7(29). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/8ff2/b011d5cb78901bf54742817a7141fd5fe0b8.pdf>
  54. Bianchi G MN. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3049–3058.
  55. Lopes R, Caetano J, Ferreira B, Barahona F, Carneiro EA, João C. The immune microenvironment in multiple myeloma: Friend or foe? *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):1–16.
  56. Marzo L Di, Desantis V, Solimando AG, Annese T, Nico B, Fumarulo R, et al. Microenvironment

drug emerging new players resistance in multiple myeloma : 7(37).

57. Gargiulo E, Morande PE, Largeot A, Moussay E, Paggetti J. Diagnostic and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles in B-Cell Malignancies. *Front Oncol.* 2020;10(September):1–9.
58. Chen T, Moscvin M, Bianchi G. Exosomes in the Pathogenesis and Treatment of Multiple Myeloma in the Context of the Bone Marrow Microenvironment. *Front Oncol.* 2020;10(November):1–7.
59. Romano A, Conticello C, Cavalli M, Vetro C, La Fauci A, Parrinello NL, et al. Immunological dysregulation in multiple myeloma microenvironment. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
60. Kocoglu M, Badros A. The role of immunotherapy in multiple myeloma. *Pharmaceuticals.* 2016;9(1).
61. Dhodapkar M V., Krasovsky J, Osman K, Geller MD. Vigorous Premalignancy-specific Effector T Cell Response in the Bone Marrow of Patients with Monoclonal Gammopathy. *J Exp Med.* 2003;198(11):1753–7.
62. Dhodapkar M V., Sexton R, Das R, Dhodapkar KM, Zhang L, Sundaram R, et al. Prospective analysis of antigen-specific immunity, stem-cell antigens, and immune checkpoints in monoclonal gammopathy. *Blood.* 2015;126(22):2475–8.
63. Bailur JK, McCachren SS, Doxie DB, Shrestha M, Pendleton K, Nooka AK, et al. Early alterations in stem-like/marrow-resident T cells and innate and myeloid cells in preneoplastic gammopathy. *JCI Insight.* 2019;4(11):1–10.
64. Squibb M, Nakamura K, Smyth MJ, Martinet L. Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple myeloma Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: Clinical trial registration information (if any): Title: Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple my. 2021; Available from: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/doi/10.1182/blood.2020006540/1748307/blood.2020006540.pdf>
65. Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D, et al. Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia [Internet].* 2015;29(6):1441–4. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.11>

66. Cohen AD, Raje N, Fowler JA, Mezzi K, Scott EC, Dhodapkar M V. How to train your T cells: Overcoming immune dysfunction in multiple myeloma a C. Vol. 26, Clinical Cancer Research. 2020. 1541–1554 p.
67. Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor- $\beta$ 1 and interleukin-10. Blood [Internet]. 2001;98(10):2992–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.10.2992>
68. Shinde P, Fernandes S, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. Compromised functionality of monocyte-derived dendritic cells in multiple myeloma patients may limit their use in cancer immunotherapy. Sci Rep [Internet]. 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23943-w>
69. Favaloro J, Liyadipitiya T, Brown R, Yang S, Suen H, Woodland N, et al. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2014;55(12):2893–900.
70. Panchabhai S, Kelemen K, Ahmann G, Sebastian S, Mantei J, Fonseca R. Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. Leukemia [Internet]. 2016;30(4):951–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.191>
71. Wang H, Hu WM, Xia ZJ, Liang Y, Lu Y, Lin SX, et al. High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages correlate with poor prognosis in multiple myeloma patients receiving bortezomib-based regimens. J Cancer. 2019;10(14):3239–45.
72. Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. Blood. 2005;105(1):251–8.
73. El-sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The Requirement for DNAM-1 , NKG2D , and NKp46 in the Natural Killer Cell-Mediated Killing of Myeloma Cells. 2007;(18):8444–50.

74. Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1285–90.
75. Lu X, Zhu A, Cai X, Jia Z, Han W, Ma L, et al. Role of NKG2D in cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(8):623–9.
76. Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, Le Treut T, et al. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology*. 2013;139(3):338–41.
77. Godfrey J, Benson DM. The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(9):1666–76.
78. Marchica V, Costa F, Donofrio G, Giuliani N. Oncolytic virotherapy and microenvironment in multiple myeloma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):1–16.
79. Garcia-iglesias T, Toro-arreola A, Albarran- B, Toro-arreola S, Sanchez-hernandez PE, Ramirez-dueñas MG, et al. activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. 2009;8:1–8.
80. Stringaris K, Sekine T, Khoder A, Alsuliman A, Razzaghi B, Sargeant R, et al. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. 2014;99(5).
81. Sarkar S, Gelder M Van, Noort W, Xu Y, Rouschop KMA, Groen R, et al. Optimal selection of natural killer cells to kill myeloma: the role of HLA - E and NKG2A. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;951–63.
82. Chiossone L, Vienne M, Kerdiles YM, Vivier E. Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more. *Semin Immunol* [Internet]. 2017;31(June):55–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.003>
83. Cichocki F, Cooley S, Davis Z, DeFor TE, Schlums H, Brunstein CG, et al. reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. 2016;30(2):456–63.
84. Rambaldi B, Kim HT, Reynolds C, Rai SC, Arihara Y, Kubo T, et al. Impaired T- And NK-cell reconstitution after haploidentical HCT with posttransplant cyclophosphamide. *Blood Adv*.

2021;5(2):352–64.

85. Heaney JLI, Campbell JP, Iqbal G, Cairns D, Richter A, Child JA, et al. Characterisation of immunoparesis in newly diagnosed myeloma and its impact on progression-free and overall survival in both old and recent myeloma trials. *Leukemia*. 2018;1727–38.
86. Arteché-López A, Kreutzman A, Alegre A, Sanz Martín P, Aguado B, González-Pardo M, et al. Multiple myeloma patients in long-term complete response after autologous stem cell transplantation express a particular immune signature with potential prognostic implication. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2017;52(6):832–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2017.29>
87. Zhang L, Tai YT, Ho M, Xing L, Chauhan D, Gang A, et al. Regulatory B cell-myeloma cell interaction confers immunosuppression and promotes their survival in the bone marrow milieu. *Blood Cancer J*. 2017;7(3):2–5.
88. Zhongqing Zou, Tingting Guo, Cui J, Tang W, Li Y, Wang F, et al. Real-world data combined with studies on Regulatory B Cells for newly diagnosed Multiple Myeloma from a tertiary referral Hospital in South-Western China. *J Cancer*. 2021;12(9):2633–42.
89. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(12):e538–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
90. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA, Snyder MR, Plevak MF, Larson DR, et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(12):1575–8.
91. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21–33.
92. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma - The Lancet Oncology.
93. Paiva B, Puig N, Böttcher S, Velden VHJ Van Der. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. 2017;(November 2016):2094–103.



94. Roshal M, Flores-montero JA, Gao Q, Koeber M, Wardrope J, Durie BGM, et al. REGULAR ARTICLE MRD detection in multiple myeloma : comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods. 2017;1(12):2–4.
95. Roshal M. Minimal Residual Disease Detection by Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Why and How? *Semin Hematol* [Internet]. 2018;55(1):4–12. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.02.011>
96. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus Guidelines on Plasma Cell Myeloma Minimal Residual Disease Analysis and Reporting. 2016;39(December 2014):31–9.
97. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(2):269–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.247>
98. Pawlyn C, Cairns D, Kaiser M, Striha A, Jones J, Shah V, et al. The relative importance of factors predicting outcome for myeloma patients at different ages: results from 3894 patients in the Myeloma XI trial. *Leukemia* [Internet]. 2020;34(2):604–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0595-5>
99. Corre J, Munshi NC, Avet-Loiseau H. Risk factors in multiple myeloma: Is it time for a revision? *Blood*. 2021;137(1):16–9.
100. Kumar SK, Gertz MA. Risk adapted therapy for multiple myeloma: Back to basics. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(10):2219–20.
101. Avet-Loiseau H. Ultra high-risk myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:489–93.
102. Usmani SZ, Heuck C, Mitchell A, Szymonifka J, Nair B, Hoering A, et al. Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica*. 2012;97(11):1761–7.
103. Aljama MA, Sidiqi MH, Dingli D. Therapy for relapsed multiple myeloma. *Panminerva Med*. 2018;60(4):174–84.
104. González M, Chillón MC, Marín L, Corral R, Alcoceba M, Balanzategui A, et al. Utilidad en la práctica clínica de la detección de la enfermedad mínima residual. 2011;96(Extra 1):3–7.

105. Hart AJ, Jagasia MH, Kim AS, Mosse CA, Savani BN, Kassim A. Minimal Residual Disease in Myeloma: Are We There Yet? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(12):1790–9.
106. Hematología S, Médula DT De. Importancia clínica de la evaluación de la enfermedad mínima residual en mieloma múltiple . 2017;152–7.
107. Greipp PR, Miguel JS, Dune BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412–20.
108. Palumbo A, Avet-loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Revised International Staging System for Multiple Myeloma : A Report From International Myeloma Working Group. 2015;33(26).
109. Kastritis E, Terpos E, Roussou M, Gavriatopoulou M, Migkou M, Eleutherakis-Papaiakovou E, et al. Evaluation of the revised international staging system in an independent cohort of unselected patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2017;102(3):593–9.
110. Buadi FK, Pandey S, Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(5):1122–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4000285&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157580><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4000285><http://www.nature.com/doifinder/>
111. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1565–71.
112. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2487–98.
113. Vu T, Gonsalves W, Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, et al. Characteristics of exceptional responders to lenalidomide- based therapy in multiple myeloma. 2015;(September).
114. Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong MV, Ott CJ, Mitsiades CS, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of ikaros proteins. *Science* (80-

- ). 2014;343(6168):305–9.
115. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006;107(12):4907–16.
  116. Rajkumar S, Jacobus S, Callander N. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-. *Lancet Oncol*. 2010;11(1):29–37.
  117. Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10068):519–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31594-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31594-X)
  118. Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Belhadj K, Benboubker L, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10192):29–38.
  119. Goldschmidt H, Lokhorst HM, Mai EK, Van Der Holt B, Blau IW, Zweegman S, et al. Bortezomib before and after high-dose therapy in myeloma: Long-term results from the phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Leukemia* [Internet]. 2018;32(2):383–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.211>
  120. Barlogie B, Anaissie E, Van Rhee F, Haessler J, Hollmig K, Pineda-Roman M, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: Early results of total therapy 3. *Br J Haematol*. 2007;138(2):176–85.
  121. Van Rhee F, Szymonifka J, Anaissie E, Nair B, Waheed S, Alsayed Y, et al. Total Therapy 3 for multiple myeloma: Prognostic implications of cumulative dosing and premature discontinuation of VTD maintenance components, bortezomib, thalidomide, and dexamethasone, relevant to all phases of therapy. *Blood*. 2010;116(8):1220–7.
  122. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, Hari P, Bashey A, Devine S, et al. Autologous

- transplantation, consolidation, and maintenance therapy in multiple myeloma: Results of the BMT CTN 0702 trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(7):589–97.
123. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, et al. Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma. *N Engl J Med*. 2014;371(10):906–17.
  124. Petrucci MT, Catalano J, Gisslinger H, Wiktor-jędrzejczak W, Ph D, Zodelava M, et al. new england journal. 2012;1759–69.
  125. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H, Richardson PG, et al. Lenalidomide after Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1770–81.
  126. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IGH, Van Der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, Salwender H, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: Results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(24):2946–55.
  127. Dimopoulos MA, Gay F, Schjesvold F, Beksac M, Hajek R, Weisel KC, et al. Oral ixazomib maintenance following autologous stem cell transplantation (TOURMALINE-MM3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10168):253–64.
  128. Tamura H, Ishibashi M, Sunakawa M, Inokuchi K. Immunotherapy for multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1–15.
  129. Martinez-lopez J, Blade J, Mateos M, Grande C, Sureda A, Rubia J De, et al. Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. 2019;118(3):529–35.
  130. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1726–37.
  131. Wang Y, Li H, Xu W, Pan M, Qiao C, Cai J, et al. BCMA-targeting Bispecific Antibody That Simultaneously Stimulates NKG2D-enhanced Efficacy against Multiple Myeloma. *J Immunother*. 2020;43(6):175–88.
  132. Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J. International uniform response

- criteria for multiple myeloma. 2006;1467–73.
133. Nassin ML, Nicolaou E, Gurbuxani S, Cohn SL, Cunningham JM, LaBelle JL. Immune Reconstitution Following Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with High-Risk Neuroblastoma at the Time of Immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2018;24(3):452–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.012>
  134. Hoepfner S, Haut PR, O’Gorman M, Kletzel M. Rapid immune reconstitution following autologous hematopoietic stem cell transplantation in children: A single institution experience. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(4):285–90.
  135. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(2):329–48.
  136. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* [Internet]. 2016;7(8):901–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1208866>
  137. Thoma MD, Huneke TJ, DeCook LJ, Johnson ND, Wiegand RA, Litzow MR, et al. Peripheral blood lymphocyte and monocyte recovery and survival in acute leukemia postmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2012;18(4):600–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.08.007>
  138. Galvez-Silva J, Maher OM, Park M, Liu D, Hernandez F, Tewari P, et al. Prognostic Analysis of Absolute Lymphocyte and Monocyte Counts after Autologous Stem Cell Transplantation in Children, Adolescents, and Young Adults with Refractory or Relapsed Hodgkin Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2017;23(8):1276–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.04.013>
  139. Kim HT, Armand P, Frederick D, Andler E, Cutler C, Koreth J, et al. Absolute lymphocyte count recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2015;21(5):873–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.01.019>
  140. Chakrabarti S, Brown J, Guttridge M, Pamphilon DH, Lankester A, Marks DI. Early lymphocyte recovery is an important determinant of outcome following allogeneic transplantation with CD34+ selected graft and limited T-cell addback. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(1):23–

- 30.
141. Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, et al. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br J Haematol*. 2006;134(6):596–601.
142. Rueff J, Medinger M, Heim D, Passweg J, Stern M. Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2014;20(6):896–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.03.007>
143. Russo A, Oliveira G, Berglund S, Greco R, Gambacorta V, Cieri N, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: Dynamics and clinical implications. *Blood*. 2018;131(2):247–62.
144. Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, Sharma S, Leung S, Curran SA, et al. T-cell exhaustion in Multiple myeloma relapse after autotransplant: Optimal timing of immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(1):61–71.
145. Abrahamsen IW, Sømme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjønnfjord GE. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: The impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2005;90(1):86–93.
146. Small T, Keever C, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly R, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* [Internet]. 1990;76(8):1647–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V76.8.1647.1647>
147. Burns DM, Tierney R, Shannon-Lowe C, Croudace J, Inman C, Abbotts B, et al. Memory B-cell reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is an EBV-associated transformation event. *Blood*. 2015;126(25):2665–75.
148. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: Characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008;127(1):14–25.
149. Gernert M, Tony HP, Schwaneck EC, Fröhlich M, Schmalzing M. Low B cell counts as risk factor for infectious complications in systemic sclerosis after autologous hematopoietic stem cell

- transplantation. *Arthritis Res Ther*. 2020;22(1):1–9.
150. Porrata LF, Litzow MR, Markovic SN. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(4):407–12.
  151. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1998;92(5):1471–90.
  152. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: Challenges for the future. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:S53–7.
  153. Głowala-Kosińska M, Chwieduk A, Smagur A, Fidyk W, Najda J, Mitrus I, et al. Thymic Activity and T Cell Repertoire Recovery after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Preceded by Myeloablative Radiotherapy or Chemotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(5):834–42.
  154. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest*. 2005;115(4):930–9.
  155. Azevedo RI, Soares M V.D., Albuquerque AS, Tendeiro R, Soares RS, Martins M, et al. Long-term immune reconstitution of naive and memory t cell pools after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2013;19(5):703–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.01.017>
  156. Nordøy T, Kolstad A, Endresen P, Holte H, Kvaløy S, Kvalheim G, et al. Persistent changes in the immune system 4-10 years after ABMT. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24(8):873–8.
  157. Mayo-agosto N. Reconstitución inmunológica en niños receptores de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. 2012;21:72–9.
  158. Gupta N, Sharma A, Sharma A. Emerging biomarkers in Multiple Myeloma: A review. *Clin Chim Acta*. 2020;503(August 2019):45–53.
  159. Attar-Schneider O, Drucker L, Zismanov V, Tartakover-Matalon S, Rashid G, Lishner M. Bevacizumab attenuates major signaling cascades and eIF4E translation initiation factor in multiple myeloma cells. *Lab Investig* [Internet]. 2012;92(2):178–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2011.162>

160. Kumar R, Gupta N, Himani, Sharma A. Novel combination of tanshinone I and lenalidomide induces chemo-sensitivity in myeloma cells by modulating telomerase activity and expression of shelterin complex and its associated molecules. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2018;45(6):2429–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4409-z>
161. Gonsalves WL, Morice WG, Rajkumar V, Gupta V, Timm MM, Dispenzieri A, et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2014;167(4):500–5.
162. Thakral D, Das N, Basnal A, Gupta R. Cell-free DNA for genomic profiling and minimal residual disease monitoring in Myeloma- are we there yet? *Am J Blood Res* [Internet]. 2020;10(3):26–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32685257><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7364270>
163. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ, et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* [Internet]. 2013;27(1):208–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.189>
164. Aljijakli A. Involved / uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to multiple myeloma. 2014;755–8.
165. Froebel KS, Pakker NG, Aiuti F, Bofill M, Choremi-Papadopoulou H, Economidou J, et al. Standardisation and quality assurance of lymphocyte proliferation assays for use in the assessment of immune function. *J Immunol Methods*. 1999;227(1–2):85–97.
166. Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Gastineau DA, et al. Early Lymphocyte Recovery Predicts Superior Survival after Autologous Stem Cell Transplantation in Non-Hodgkin Lymphoma: A Prospective Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(7):807–16.
167. Porrata LF, Litzow MR, Tefferi A, Letendre L, Kumar S, Geyer SM, et al. Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2002;16(7):1311–8.



168. Park J, Lim SH, Kim SH, Yun J, Kim CK, Lee SC, et al. Is immunological recovery clinically relevant at 100 days after allogeneic transplantation ? 2020;1–13.
169. Anderson KC, Ritz J, Takvorian T, Coral F, Daley H, Gorgone BC, et al. Hematologic engraftment and immune reconstitution posttransplantation with anti-B1 purged autologous bone marrow. Vol. 69, Blood. 1987. p. 597–604.
170. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol [Internet]. 2014;27(1):16–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
171. Corso A, Castelli G, Pagnucco G, Lazzarino M, Bellio L, Klersy C BC. Bone marrow T-cell subsets in patients with monoclonal gammopathies: correlation with clinical stage and disease status. Haematologica. 1997;82(1):43–6.
172. Noonan K, Matsui W, Serafini P, Carbley R, Tan G, Khalili J, et al. Activated marrow-infiltrating lymphocytes effectively target plasma cells and their clonogenic precursors. Cancer Res. 2005;65(5):2026–34.
173. Minnie SA, Hill GR. Immunotherapy of multiple myeloma. J Clin Invest. 2020;130(4):1565–75.
174. Miguel JFS, González M, Gascón A, Moro J, Hernández JM, Ortega F, et al. Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. Br J Haematol. 1992;80(3):305–9.
175. Kay NE, Leong TL, Bone N, Vesole DH, Greipp PR, Van Ness B, et al. Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: Results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients. Blood. 2001;98(1):23–8.
176. Ege H, Gertz MA, Markovic SN, Lacy MQ, Dispenzieri A, Hayman SR, et al. Prediction of survival using absolute lymphocyte count for newly diagnosed patients with multiple myeloma: A retrospective study. Br J Haematol. 2008;141(6):792–8.
177. Gu Y, Jin Y, Ding J, Yujie W, Shi Q, Qu X, et al. Low absolute CD4+ T cell counts in peripheral blood predict poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. Leuk Lymphoma [Internet]. 2020;61(8):1869–76. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1751840>

178. Bengtsson M, Smedmyr B, Festin R, öberg G, Simonsson B, Tötterman TH. B lymphocyte regeneration in marrow and blood after autologous bone marrow transplantation: Increased numbers of B cells carrying activation and progression markers. *Leuk Res.* 1989;13(9):791–7.
179. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: A recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood.* 1990;76(8):1647–56.
180. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 2007;110(1):296–304.
181. Tamura H, Ishibashi M, Yamashita T, Tanosaki S, Okuyama N, Kondo A, et al. Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2013;27(2):464–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.213>
182. Tamura H. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple myeloma. *Int J Hematol* [Internet]. 2018;107(3):278–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2405-7>
183. Verkleij CPM, Jhatakia A, Broekmans MEC, Frerichs KA, Zweegman S, Mutis T, et al. Preclinical rationale for targeting the PD-1/PD-L1 axis in combination with a CD38 antibody in multiple myeloma and other CD38- positive malignancies. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):1–20.
184. Puig N, Corchete-Sánchez LA, Pérez-Morán JJ, Dávila J, Paíno T, de la Rubia J, et al. Pembrolizumab as consolidation strategy in patients with multiple myeloma: Results of the GEM-pembresid clinical trial. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):1–13.
185. Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H, Vasir B, Tzachanis D, Levine JD, et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo t-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *J Immunother.* 2011;34(5):409–18.
186. Guillerey C, Harjunpää H, Harjunpää H, Harjunpää H, Nad` N, Carrí N, et al. Brief Report IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8 1 T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2018;132(16):1689–94.

Available from: [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org)

187. Beyer M, Kochanek M, Giese T, Endl E, Weihrauch MR, Knolle PA, et al. In vivo peripheral expansion of naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006;107(10):3940–9.
188. Raja K, Raja M, Rihova L, Zahradova L, Klinecova M, Penka M, et al. Increased T Regulatory Cells Are Associated with Adverse Clinical Features and Predict Progression in Multiple Myeloma. 2012;7(10).
189. Hadjiaggelidou C, Mandala E, Terpos E, Yiannaki E, Markala D, Triantafyllou T, et al. Evaluation of regulatory T cells (Tregs) alterations in patients with multiple myeloma treated with bortezomib or lenalidomide plus dexamethasone: correlations with treatment outcome. *Ann Hematol*. 2019;
190. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, et al. Daratumumab depletes CD38<sup>+</sup> immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3):384–94.
191. Pilarski LM, Joy Andrews E, Mant MJ, Ruether BA. Humoral immune deficiency in multiple myeloma patients due to compromised B-cell function. *J Clin Immunol*. 1986;6(6):491–501.
192. Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol*. 1998;100(1):176–83.
193. Magalhães RJP De, Vidriales M, Paiva B, Fernandez-gimenez C, Mateos M, Gutierrez NC, et al. Multiple Myeloma Articles Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. 2013;98(1):79–86.
194. Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Las Heras N, De Coca AG, et al. Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: Comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol*. 2010;148(1):110–4.
195. Semeraro M, Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, et al. Trial Watch: Lenalidomide-based immunochemotherapy. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):1–15.

196. Jurisic V, Srdic AET, Konjevic AEG, Bone LDHÁ, Clinical Á. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. 2007;312–7.
197. Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Santoni A, Cippitelli M. NKG2D and DNAM-1 Ligands: Molecular Targets for NK Cell-Mediated Immunotherapeutic Intervention in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
198. Von Lilienfeld-Toal M, Frank S, Leyendecker C, Feyler S, Jarmin S, Morgan R, et al. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(6):829–39.
199. Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Santoni A, Cippitelli M. NKG2D and DNAM-1 Ligands: Molecular Targets for NK Cell-Mediated Immunotherapeutic Intervention in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
200. Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, Kuszynski CA, Perry GA, Gordy CL, et al. Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. Vol. 17, *Bone Marrow Transplantation*. 1996. p. 101–9.
201. Ashihara E, Shimazaki C, Yamagata N, Hirata T, Okawa K, Oku N, et al. Reconstitution of lymphocyte subsets after peripheral blood stem cell transplantation: Two-color flow cytometric analysis. Vol. 13, *Bone Marrow Transplantation*. 1994. p. 377–81.
202. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. Vol. 92, *Blood*. 1998. p. 1471–90.
203. Koehne G, Zeller W, Stocksclaeder M, Zander AR. Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(2):149–56.
204. Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(2):161–72.
205. Steingrimsdottir H, Gruber A, Björkholm M, Svensson A HM. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications. *Haematologica*. 2000;85(8):832–8.

206. Parra C, Roldán E, Rodríguez C, Pérez de Oteyza J, Oteho E, López J, Maldonado MS, García Laraña J, Muñoz A, Odriozola J BJ. Reconstitución de los linfocitos de sangre periférica en pacientes tratados con trasplante de médula ósea: comparación entre el trasplante alogénico y el autólogo [Reconstitution of peripheral blood lymphocytes in patients treated with bone marrow transpl. *Med Clin.* 1999;12(113):1–5.
207. Miller RA, Stutman O. T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses. Vol. 133, *Journal of Immunology*. 1984. p. 2925–32.
208. Mackall CL, Gress RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: Implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. Vol. 157, *Immunological Reviews*. 1997. p. 61–72.
209. Fry TJ, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL. Plenary paper Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell – depleted hosts. 2016;97(6):1525–34.
210. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski JA, et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: Thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood*. 1997;90(9):3789–98.
211. Mackall CL, Bare C V, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. [Internet]. Vol. 156, *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 1996. p. 4609–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648103>
212. Goldrath AW, Bevan MJ. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*. 1999;11(2):183–90.
213. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 1999;402(6759):255–62.
214. Fagnoni FF, Lozza L, Zibera C, Zambelli A, Ponchio L, Gibelli N, et al. T-cell dynamics after high-dose chemotherapy in adults: Elucidation of the elusive CD8+ subset reveals multiple homeostatic T-cell compartments with distinct implications for immune competence. *Immunology*. 2002;106(1):27–37.

215. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*. 1997;89(10):3700–7.
216. Lum LG, Joshi ID, Galoforo SC, Abella E, Karanes C, Ratanatharathorn V, Schultz KR, Uberti JP, Sensenbrenner LL, Ledbetter JA et al. Coactivation with anti-CD28 monoclonal antibody enhances anti-CD3 monoclonal antibody-induced proliferation and IL-2 synthesis in T cells from autologous bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transpl*. 1993;12(6):156–71.
217. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. *Front Immunol*. 2019;10(OCT):1–17.
218. Fumoux F, Guigou V, Blaise D, Maraninchi D, Fougereau M, Schiff C. Reconstitution of human immunoglobulin VH repertoire after bone marrow transplantation mimics B-cell ontogeny. *Blood*. 1993;81(11):3153–7.
219. Suzuki I, Milner ECB, Glas AM, Hufnagle WO, Rao SP, Pfister L, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in bone marrow transplant recipients: Lack of somatic mutation indicates a maturational arrest. *Blood* [Internet]. 1996;87(5):1873–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V87.5.1873.1873>
220. Storek J, King L, Ferrara S, Marcelo D, Saxon A, Braun J. Abundance of a restricted fetal B cell repertoire in marrow transplant recipients. Vol. 14, *Bone Marrow Transplantation*. 1994. p. 783–90.
221. Xu H, Mehta AK, Gao Q, Lee HJ, Ghali A, Guasch A, et al. B cell reconstitution following alemtuzumab induction under a belatacept-based maintenance regimen. *Am J Transplant*. 2020;20(3):653–62.
222. López J, Merino L, Piris L, Herrera FS, Llorente I, Humbría A, Ortiz AM, Velasco T, García-Vicuña R, Castañeda S, González Álvaro I M-CC. Rituximab induces a lasting, non-cumulative remodelling of the B-cell compartment. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(4):615–22.
223. Armitage RJ, Goldstone AH, Richards JDM, Cawly JC. Lymphocyte function after autologous bone marrow transplantation (BMT): a comparison with patients treated with allogeneic

- BMT and with chemotherapy only. *Br J Haematol.* 1986;63(4):637–47.
224. Chakraborty R, Rybicki L, Nakashima MO, Dean RM, Faiman BM, Samaras CJ, et al. Characterisation and prognostic impact of immunoparesis in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2020;189(6):1074–82.
  225. In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation.
  226. Blood P, Cell DS, Marrow R, Transplantation AA. Responses Marrow. 1988;72(2):672–8.
  227. Nadler LM, Botnick L, Finberg R, Canellos GP, Takvorian T, Bast RC, et al. Anti-B1 Monoclonal Antibody and Complement Treatment in Autologous Bone-Marrow Transplantation for Relapsed B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Vol. 324, *The Lancet.* 1984. p. 427–31.
  228. Murphy TM, Berzano M, Cotter DM, Mcevoy SE, Thomas K a, Whelan KF. *The Journal of the American Society of Parasitologists.* 2008;94(4):1043–52.
  229. Bayram RO, Özdemir H, Emsen A, Türk Dağı H, Artaç H. Reference ranges for serum immunoglobulin (lgg, iga, and igm) and igg subclass levels in healthy children. *Turkish J Med Sci.* 2019;49(2):497–505.
  230. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 2007;67(18):8444–9.
  231. Dg S, Natl P, Sci A, Targeting BR, Cancer NR, Signals KK, et al. Impaired activating receptor expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. :732–3.
  232. Görgün G, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, Anderson JE, et al. Lenalidomide enhances immune checkpoint blockade-induced immune response in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(20):4617–8.
  233. Laubach J, Garderet L, Mahindra A, Gahrton G, Caers J, Sezer O, et al. Management of relapsed multiple myeloma: Recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia.* 2016;30(5):1005–17.
  234. Visani G, Lemoli RM, Tosi P, Martinelli G, Testoni N, Ricci P, et al. Use of peripheral blood stem cells for autologous transplantation in acute myeloid leukemia patients allows faster engraftment and equivalent disease-free survival compared with bone marrow cells. *Bone*

- Marrow Transplant. 1999;24(5):467–72.
235. Porrata LF, Inwards DJ, Micallef IN, Ansell SM, Geyer SM, Markovic SN. Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. Vol. 117, British Journal of Haematology. 2002. p. 629–33.
236. Rubio MT, Dhuyser A, Nguyen S. Role and Modulation of NK Cells in Multiple Myeloma. Hemato. 2021;2(2):167–81.